

**Ensaio de pesticidas em feridas de poda de videira para
controlo de doenças do lenho causadas por *Neofusicoccum
parvum* e *Phaeomoniella chlamydospora***

André Filipe Machado Mota

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Engenheira Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Engenheira Teresa Margarida da Silva Nascimento

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da
Universidade de Lisboa;

Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Gostava de dirigir os meus agradecimentos principalmente aos meus pais, por ajudarem a financiar o curso e por me apoiarem durante todo o processo, facilitando assim a sua concretização.

Um agradecimento aos donos das vinhas por facultarem estas para instalação dos ensaios.

Um agradecimento às minhas orientadoras Engenheira Cecília Rego e Engenheira Teresa Nascimento e ao Engenheiro Pedro Reis que foram a principal fonte de ajuda para realização do trabalho não só pela sugestão do tema e preparação e instalação dos ensaios, como pelo registo, recolha e tratamento dos dados e fornecimento de informação atual sobre o tema por parte de ambos, e claro, disponibilidade sempre para esclarecer qualquer dúvida. No que se refere ao trabalho de laboratório, um agradecimento ao Engenheiro Pedro Reis pela paciência demonstrada em explicar e orientar-me nos vários procedimentos. Foi-me bastante facilitada a análise estatística dos dados pela organização com que estes foram registados e me foram apresentados por ambos.

Agradeço inclusive aos professores do departamento de matemática Jorge F. C. L. Cadima, Elsa Gonçalves e Manuel Campagnolo pelo esclarecimento de dúvidas relativas à análise estatística.

Também gostaria de deixar um agradecimento ao colega Engenheiro e, fundamentalmente, amigo Phill pela ajuda no funcionamento com o *software* R e por estar sempre disposto a ajudar e apoiar caso algo mais fosse necessário. Além disso, não devem ser excluídos os momentos que passei com ele durante o curso juntamente com o colega e amigo Pedro Candeias, que não hesitou em acompanhar-me nas tardes de trabalho.

Para terminar, devo agradecer aos meus dois irmãos. Ao Diogo Mota, por me ajudar na formatação do trabalho, e Ana Mota, por rever os textos ao nível da sintaxe e ortografia.

RESUMO

As doenças do lenho da videira têm ganho relevância, principalmente nos últimos anos. Neste trabalho fez-se uma compilação do conhecimento atual sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora*, um dos causadores da doença de Petri, e *Neofusicoccum parvum*, procedendo-se, igualmente, à avaliação da eficácia de pesticidas no controlo de doenças do lenho, a partir da sua aplicação em feridas de poda inoculadas com *Phaeomoniella chlamydospora* ou com *Neofusicoccum parvum* em dois ensaios. O ensaio na região de Alenquer, na casta Aragonez, revelou eficácia significativa nos tratamentos com os dois únicos pesticidas testados (Tri-Wall e Esquive) pela menor severidade e incidência dos fungos. Contudo, o comprimento da necrose apenas se revelou significativamente menor em varas tratadas, inoculadas com *Phaeomoniella chlamydospora*. No ensaio em Arruda dos Vinhos, casta Pinot Noir, houve pelo menos cinco tratamentos com eficácia no controlo de *Pa. chlamydospora* e seis no controlo de *N. parvum* com base nos dados de severidade. Os dados de incidência sugerem três tratamentos com diferenças significativas no caso de *Pa. chlamydospora* e cinco no caso de *N. parvum*. A severidade foi menor perto da ferida de poda para todos os ensaios à exceção das vinhas em Alenquer inoculadas com *N. parvum*.

Palavras-chave: Videira, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Neofusicoccum parvum*, feridas de poda, fungicidas.

ABSTRACT

Grapevine trunk diseases have achieved relevance, especially in the last years. In this work, recent information about *Phaeomoniella chlamydospora*, one of the causers of Petri disease, and *Neofusicoccum parvum* was gathered, having also been performed two essays evaluating the efficacy of several pruning wound protectants for control against *Phaeomoniella chlamydospora* and *Neofusicoccum parvum*. The essay in Alenquer (region), in the Aragonez cultivar, showed significant differences in control for the two utilized fungicides (Esquive and Tri-Wall) due to the lesser severity and incidence of the fungi. However, necrosis length only proved to be significantly shorter in treated, *Phaeomoniella chlamydospora* inoculated shoots. In the Arruda dos Vinhos essay, Pinot Noir cultivar, there were at least five treatments with efficacy in controlling *Pa. chlamydospora* and six in the case of *N. parvum* based on severity data. Incidence data suggested three treatments with significant differences in the case of *Pa. chlamydospora* and five in the case of *N. parvum* inoculated shoots. Severity was lesser near the pruning wound for all essays with the exception for *N. parvum* inoculated grapevines in Alenquer.

Key words: Grapevine, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Neofusicoccum parvum*, pruning wounds, fungicides.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
EXTENDED ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE QUADROS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
1. Introdução.....	1
2. Doença de Petri.....	3
2.2. Agentes causais.....	3
2.2.1. Taxonomia.....	3
2.3. Distribuição geográfica.....	4
2.4. Biologia.....	4
2.4.1. Fontes de inóculo.....	4
2.4.2. Vias de penetração.....	5
2.4.3. Fatores condicionantes da dispersão e manifestação da doença	5
2.5. Sintomatologia.....	5
2.6. Patogénese	8
2.7. Métodos de Controlo.....	10
2.7.1. Luta Genética.....	10
2.7.2. Luta Cultural.....	10
2.7.3. Luta Física.....	11
2.7.4. Luta Biológica.....	12
2.7.5. Luta Química.....	13
3. Doenças do lenho causadas por <i>N. parvum</i>	17
3.1. Agentes causais.....	17
3.1.1. Taxonomia.....	18
3.1.2. Distribuição geográfica.....	20
3.2. Biologia.....	22
3.2.1. Fontes de inóculo.....	22

3.2.2.	Vias de penetração.....	22
3.2.3.	Feridas de poda	23
3.2.4.	Fatores condicionantes da dispersão e manifestação da doença	23
3.3.	Sintomatologia.....	24
3.4.	Patogénese	27
3.5.	Meios de luta	28
3.5.1.	Luta cultural.....	29
3.5.2.	Luta Física.....	29
3.5.3.	Luta química	29
3.5.4.	Luta biológica	32
4.	Material e métodos.....	33
4.1.	Localização dos ensaios.....	33
4.2.	As vinhas	33
4.3.	Unidade experimental.....	34
4.4.	Isolados.....	34
4.5.	Os tratamentos	36
4.6.	Parâmetros a avaliar e método de recolha de dados.....	37
4.6.1.	Material proveniente do Ensaio 1 (Alenquer)	37
4.6.2.	Material proveniente do Ensaio 2 (Arruda dos Vinhos)	39
5.	Resultados e Discussão.....	41
5.1.	Ensaio 1 (Alenquer)	41
5.2.	Ensaio 2 (Arruda dos Vinhos).....	52
6.	Conclusão.....	63
7.	Referências bibliográficas	67
8.	Anexos.....	89
8.1.	Anexo A.....	91
8.2.	Anexo B.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1 - Colônia de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> em gelose de batata dextrosada (PDA – Potato Dextrose Agar)	4
Fig. 2.2 – Sintomas produzidos por <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> em sarmentos, troncos e folhas de videira	6
Fig. 2.3 - Cortes (transversal(A e B) e longitudinal(C e D) de videira exibindo sintomas causados por <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	7
Fig. 2.4 - A e B - Doença de Petri.....	8
Fig. 3.1 – Morfologia da cultura de <i>Neofusicoccum parvum</i> 3 dias após crescimento em PDA, a 25°C e na obscuridade	19
Fig. 3.2 – Necroses no lenho quando efetuado um corte transversal	25
Fig. 3.3 - Sintomas descritos como “Botryosphaeria canker”	27
Fig. 4.1 – Localização dos ensaios. Concelho de Alenquer (vermelho) e Concelho de Arruda dos Vinhos (verde).....	33
Fig. 4.2 - Zona de poda das videiras.....	34
Fig. 4.3 – Colônia do isolado Ph 19 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (esquerda) e do isolado Np 67 de <i>Neofusicoccum parvum</i> (direita) em PDA.....	35
Fig. 5.1 – Valores médios de severidade da doença causada por <i>N. parvum</i> após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.....	42
Fig. 5.2 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade causada por <i>N. parvum</i> nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.	43
Fig. 5.3 - Valores médios de incidência da doença causada por <i>N. parvum</i> após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.....	44
Fig. 5.4 - Comprimento da necrose da doença causada por <i>N. parvum</i> após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.....	45
Fig. 5.5 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores do comprimento da necrose (cm) causada por <i>N. parvum</i> nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.	46
Fig. 5.6 - Valores médios de severidade da doença causada por <i>Pa. chlamydospora</i> após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	47
Fig. 5.7 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade (%) causada por <i>Pa. chlamydospora</i> nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.....	48

Fig. 5.8 - Valores médios de incidência da doença causada por <i>Pa. chlamydospora</i> após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	49
Fig. 5.9 – Comprimento da necrose da doença causada por <i>Pa. chlamydospora</i> após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	50
Fig. 5.10 – Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores do comprimento da necrose (cm) causada por <i>Pa. chlamydospora</i> nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.	51
Fig. 5.11 - Severidade da doença causada por e <i>N. parvum</i> após os vários tratamentos em Arruda dos Vinhos. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	54
Fig. 5.12 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade causada por <i>N. parvum</i> pelas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 2.	56
Fig. 5.13 - Incidência da doença causada por <i>N. parvum</i> após os vários tratamentos no Ensaio 2. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	57
Fig. 5.14 - Severidade da doença causada por <i>Pa. chlamydospora</i> após os vários tratamentos em Arruda dos Vinhos. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	58
Fig. 5.15 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade causada por <i>Pa. chlamydospora</i> pelas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 2.	59
Fig. 5.16 - Incidência da doença causada por <i>Pa. chlamydospora</i> após os vários tratamentos em Arruda dos Vinhos. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.	60

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 3.1 – Sintomas em videira a partir dos quais <i>N. parvum</i> foi isolada e regiões do mundo associadas. (Adaptado de Úrbez-Torres, 2011).	21
Quadro 4.1 – Isolados de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> e <i>Neofusicoccum parvum</i> usados nos ensaios.	34
Quadro 4.2 - Tratamentos efetuados nas videiras do Ensaio 1 em Alenquer.	36
Quadro 4.3 - Tratamentos efetuados nas videiras do Ensaio 2 em Arruda dos Vinhos.	36
Quadro 5.1 - Reisolamento (%) de <i>N. parvum</i> e <i>Pa. chlamydospora</i> por nível do talão nas videiras do Ensaio 1.....	51
Quadro 5.2 – Perímetro e comprimento das varas e dos entrenós das vinhas do Ensaio 2 inoculadas com <i>N. parvum</i>	52
Quadro 5.3 - Perímetro e comprimento das varas e dos entrenós das vinhas do Ensaio 2 inoculadas com <i>Pa. chlamydospora</i>	53
Quadro 5.4 – Comprimento total das varas (cm) inoculadas com <i>N. parvum</i> e <i>Pa. chlamydospora</i>	53
Quadro 5.5 - Reisolamento (%) de <i>N. parvum</i> e <i>Pa. chlamydospora</i> por nível do talão nas videiras de Arruda dos vinhos.	61
Quadro 5.6 - Reisolamento (%) de <i>N. parvum</i> e <i>Pa. chlamydospora</i> por nível do talão nas videiras de Arruda dos vinhos, removendo as “observações atípicas”. A colorido estão demarcadas as observações que sofreram alteração devido a este facto.	62
Quadro 8.1 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de severidade de Alenquer com inoculações de <i>Neofusicoccum parvum</i>	92
Quadro 8.2 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis e inerente aos dados de incidência de Alenquer com inoculações de <i>Neofusicoccum parvum</i>	92
Quadro 8.3 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados do comprimento da necrose (cm) (com “outliers”) de Alenquer com inoculações de <i>Neofusicoccum parvum</i>	92
Quadro 8.4 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados do comprimento da necrose (cm) (sem “outliers”) de Alenquer com inoculações de <i>Neofusicoccum parvum</i>	93
Quadro 8.5 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis e inerente aos dados de severidade de Alenquer com inoculações de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	93
Quadro 8.6 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de incidência de Alenquer com inoculações de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	93
Quadro 8.7 – ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de comprimento da necrose (cm) (com “outliers”) de Alenquer com inoculações de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	94
Quadro 8.8 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de comprimento da necrose (cm) (sem “outliers”) de Alenquer com inoculações de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	94

Quadro 8.9 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade de Arruda dos Vinhos com inoculações de <i>Neofusicoccum parvum</i>	96
Quadro 8.10 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade (sem “outliers”) de Arruda dos Vinhos com inoculações de <i>Neofusicoccum parvum</i>	97
Quadro 8.11 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade de Arruda dos Vinhos com inoculações de <i>Pa. chlamydospora</i>	98
Quadro 8.12 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade (sem “outliers”) de Arruda dos Vinhos com inoculações de <i>Pa. chlamydospora</i>	99
Quadro 8.13 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de incidência de Arruda dos Vinhos com inoculações de <i>N. parvum</i>	100
Quadro 8.14 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey com correção de Bonferroni e inerente aos dados de incidência de Arruda dos Vinhos com inoculações de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	101

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA - Black Dead Arm

EPS – Exopolisacarídeos

GLSD – Grapevine Leaf Stripe Disease

ISA - Instituto Superior de Agronomia

NUV – Near Ultraviolet

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDA – Potato Dextrose Agar

PDB – Potato Dextrose Broth

rDNA - Ácido Desoxirribonucleico recombinante

RNA - Ácido Ribonucleico

1. Introdução

A importância deste trabalho reside no facto de existir uma crescente preocupação com os prejuízos derivados da destruição de vinhas causada por doenças do lenho da videira, nomeadamente fungos da família Botryosphaeriaceae, responsáveis pelas botriosferioses, e *Phaeomoniella chlamydospora*, um dos agentes causadores da esca e, no caso do declínio de videiras jovens, da doença de Petri.

Para além destes fungos, existem outros causadores de doenças no lenho. Ainda no caso da esca, conhecida por sintomas como apoplexia e, no caso da Califórnia, “black measles” (Mugnai *et al.*, 1999), esta é inicialmente causada por *Pa. chlamydospora* e fungos do género *Phaeoacremonium*, *Eutypa lata*, fungos Botryosphaeriaceae e basidiomicetas dos géneros *Fomitiporia* e *Stereum* (podridão branca) que operam nos estados finais de degradação da madeira (Rego & Oliveira *et al.*, 2011, Surico *et al.*, 2008; Fischer, 2006). No caso da doença de Petri, além de *Pa. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. (Gramaje & Armengol, 2011) também fungos como *Cadophora luteo-olivacea* e *Pleurostoma richardsiae* podem estar envolvidos (Fuente *et al.*, 2016). No declínio de videiras jovens também podem estar envolvidos fungos dos géneros *Ilyonectria*, *Campylocarpon*, *Dactylonectria*, *Cylindrocladiella* e *Neonectria* causadores do pé negro (Lombard *et al.*, 2014).

A escoriose americana, causada por *Phomopsis viticola*, afeta tanto plantas adultas como jovens (Rego & Oliveira *et al.*, 2011).

Segundo Pinto (2010), o estudo da esca desenvolveu-se ao longo de três períodos. Um primeiro período com início em 1898, por Ravaz, e fim em 1926, com Viala, em que estes autores concluíram que os agentes causais da esca eram *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. e *Phellinus igniarius* (L.:Fr.) Quél. Em, 1912 na Sicília, Petri, numa pesquisa não especificamente dirigida à esca, mas sim a problemas do declínio da vinha provocado pela filoxera, descreveu sintomas de acastanhamentos ao longo do sistema vascular de videiras em declínio acompanhadas de formação de goma em tecidos lenhosos. Das estrias castanhas isolou consistentemente duas espécies de *Cephalosporium* e uma de *Acremonium*. Segundo Mugnai *et al.* (1999) e com base na descrição de Petri, estes fungos foram mais tarde respetivamente denominados por *Pm. chlamydosporum* e *Pm. aleophilum*, tendo sido o primeiro reclassificado como *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous & Gams, 2000).

O segundo período começou na Califórnia em 1957 com Hewitt e foi até 1959, com Chiarappa a referir a relação entre as pontuações pretas que apareciam nos bagos (sarampo preto) e a morte do lenho. Também demonstrou que o fungo *Cephalosporium* sp. reproduzia *in vivo* alguns sintomas observados no lenho de videiras doentes e que *Phellinus igniarius*, um basidiomiceta, causava morte do lenho *in vitro*.

O terceiro período começou em 1987 com Larignon e Dubos, que consideraram a esca e outras doenças relacionadas associadas a um complexo de fungos atuando em conjunto com basidiomicetas ou isoladamente (Mugnai *et al.*, 1999).

Nos anos seguintes, os estudos sobre as doenças do lenho, estenderam-se a Itália, África do Sul e Califórnia (Pinto, 2010). O ressurgimento do interesse pelas doenças do lenho deveu-se primeiro à proibição do uso de arsenito de sódio e segundo à descoberta do declínio das videiras em muitas vinhas jovens (Pinto, 2010).

Em 1925, Ravaz e Verge introduziram a designação de escoriose europeia para descrever uma doença característica em vinhas distribuídas por várias regiões de França. Este constituiu o primeiro registo sobre o estudo das botriosferioses, que, na altura, ainda eram desconhecidas. Em subsequentes estudos sobre botriosferioses efetuados ao longo dos anos verificou-se certa confusão relativa a qual o fungo causador da doença e o tipo de sintomas observados. Isto deveu-se não só à utilização de técnicas pouco eficientes de identificação como à deteção de novos sintomas por diferentes autores. Ainda assim, o número de espécies da família Botryosphaeriaceae identificadas até à data, bem como os vários tipos de sintomas associados, apresenta-se vasto, fazendo este trabalho referência às que foram detetadas em videira, não sendo possível detalhar sobre o fungo *N. parvum* de forma dissociada dos restantes fungos Botryosphaeriaceae patogénicos de videira.

Estudos epidemiológicos têm permitido conhecer as vias de penetração destes fungos no hospedeiro, a sua origem e meios de dispersão, concluindo-se sobre a importância das feridas de poda como uma das principais vias de penetração destes fungos e da aplicação de fungicidas a estas como medida preventiva.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da eficácia biológica de diferentes fungicidas e agentes de controlo biológico, na proteção e desinfeção de feridas de poda contra *Neofusicoccum parvum* e *Phaeomoniella chlamydospora* em condições de campo.

2. Doença de Petri

A doença de Petri é conhecida mundialmente, afetando tanto videiras destinadas à produção de vinho como de uva de mesa reduzindo os índices de produtividade e até a própria viabilidade da vinha (Dubos & Larignon, 1988; Morton, 2000; Oliveira *et al.*, 2004; Rego, 2004; Edwards *et al.* 2007a, b). Em Portugal, na década de 90, começou a ser detetada em vinhas jovens na sequência de uma intensiva replantação de vinhas velhas (Rego *et al.*, 2000).

A elevada incidência e severidade da doença conduz frequentemente ao arranque das plantas, já que a baixa de produção torna insustentável a manutenção destas vinhas (Pinto, 2010).

2.2. Agentes causais

Várias espécies têm sido associadas a esta doença com o aumento dos estudos etiológicos, com especial ênfase para *Phaeomoniella chlamydospora* e fungos do género *Phaeoacremonium* (Mugnai *et al.*, 1999). Este trabalho apenas se foca no estudo de *Pa. chlamydospora*.

2.2.1. Taxonomia

Crous *et al.* (1996) realocaram, no género *Phaeoacremonium*, isolados de *Cephalosporium* e *Phialophora* procedentes de videira. Dentro deste género incluíram as espécies *Pm. chlamydosporum* W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & L. Mugnai, *Pm. aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai, *Pm. inflatipes* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. e *Pm. angustius* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. Baseando-se em critérios morfológicos e estudos genéticos prévios (Dupont *et al.*, 1998), que mostravam diferenças entre *Pm. chlamydosporum* e as restantes espécies de *Phaeoacremonium*, Crous & Gams (2000) criaram um novo género, *Phaeomoniella*, onde incluíram *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams (ex - *Pm. chlamydosporum*).

Ainda que algumas fontes sugiram que o género *Phaeomoniella* pertença à família Herpotrichiellaceae, ordem Chaetothyriales (Enciclopedia of Life, www.eol.org, novembro 2016; Global Catalogue of Microorganisms, gcm.wfcc.info, novembro 2016), outras fontes (Global Biodiversity Information Facility www.gbif.org, novembro de 2016; Index Fungorum, www.indexfungorum.org, novembro 2016; Catalogue of Life, www.catalogueoflife.org, novembro 2016) sugerem que o género *Phaeomoniella* encontra-se identificado como pertencente à família Phaeomoniellaceae, Ordem Phaeomoniellales, Subclasse Chaetothyriomycetidae, Classe Eurotiomycetes, Filo Ascomycota, Reino Fungi.

As colónias apresentam um aspeto cinzento-oliváceo a preto-oliváceo e atingem um raio de 5-6 mm a 25°C em 8 dias, na obscuridade (Fig. 2.1) (Pinto, 2010). Nas margens a frente de crescimento é esbranquiçada.



Fig. 2.1 - Colônia de *Phaeomoniella chlamydospora* em gelose de batata dextrosada (PDA – Potato Dextrose Agar) (Pinto 2010).

2.3. Distribuição geográfica

Os países onde *Pa. chlamydospora* já foi assinalada são: África do Sul, Argentina, Austrália, Chile, EUA, França, Itália, Nova Zelândia, Portugal (Crous & Gams, 2000; Edwards & Pascoe, 2004; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009; Halleen *et al.*, 2003; Larignon & Dubos, 1997; Martín & Cobos, 2007; Mostert *et al.*, 2006; Pollastro *et al.*, 2000; Ridgway *et al.*, 2002; Scheck *et al.*, 1998.) e Uruguai (Abreo *et al.*, 2011). Em Portugal, foram Rego *et al.* (2000) quem referiu pela primeira vez os fungos *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, num estudo feito no Ribatejo e Oeste e na Beira Litoral, após avaliação fitossanitária de materiais de propagação vegetativa de videira. Igualmente, Chicau *et al.* (2000), na região dos vinhos verdes, referiram a presença destes fungos.

2.4. Biologia

De entre os aspetos inerentes à biologia de *Pa. chlamydospora* interessa referir as fontes de inóculo, as vias de penetração no hospedeiro e fatores condicionantes à dispersão e manifestação da doença.

2.4.1. Fontes de inóculo

O inóculo pode ser proveniente de materiais de propagação vegetativa infetados, de solos infetados ou inóculo aéreo (Mostert *et al.*, 2006). Normalmente, a doença provém de plantas-mãe de porta-enxertos e garfos já infetados (Rego *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005). Segundo Pinto (2010), *Pa. chlamydospora* não é detetada nesta fase, mas existem evidências experimentais na Nova Zelândia (Whiteman *et al.*, 2003), na África do Sul (Retief *et al.*, 2005) e Austrália (Waite & Morton, 2007) de que os materiais são contaminados no decurso das várias operações levadas a efeito nos viveiros, nomeadamente, operações de hidratação, enxertia (instrumentos contaminados) e calogénese, tendo sido detetada *Pa. chlamydospora* nestas fases. Além disso, *Pa. chlamydospora* foi detetada em material de propagação e em enxertos prontos, segundo Gimenez-Jaime *et al.* (2006) e Bertelli *et al.* (1998). Podendo o rácio de infeção incrementar de 40% antes dos cortes para 70% após operações em viveiro (Gramaje & Armengol, 2011).

2.4.2. Vias de penetração

Basicamente, ao longo de todos os estágios de crescimento e de produção, as videiras estão sujeitas a ferimentos que constituem portas de entradas (Fuente *et al.*, 2016). Considera-se a penetração através de feridas da poda como sendo a via preferencial de infecção destes fungos (Mostert *et al.*, 2006). Eskalen *et al.* (2007a) relataram suscetibilidade de feridas de poda à infecção por *Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora* independentemente do período do ano. A colonização de *Pa. chlamydospora* por esta via é levada a cabo por conídios transportados pelos salpicos da chuva (Pinto, 2010) e salpicos de chuva (Rego comunicação pessoal, 2017). Os conídios são libertados por picnídios (Baloyi & Halleen, 2016). Os esporos de *Pa. chlamydospora* são detetáveis todo o ano (Larignon & Dubos, 2000) sendo capaz de sobreviver no solo, durante vários meses, sob a forma de conídios, micélio e clamidósporos, esporos de resistência (Bettiga, 2013).

2.4.3. Fatores condicionantes da dispersão e manifestação da doença

Eskalen & Gubler (2001) associaram a chuva, durante o Inverno e início de Primavera, à libertação e dispersão de esporos, em estudos na Califórnia. Apoiando estas conclusões relativamente a *Pa. chlamydospora*, embora referindo uma maior dispersão de *Phaeoacremonium* spp. durante Verões chuvosos, temos os estudos de van Niekerk *et al.* (2005) na África do Sul.

As infecções por *Pa. chlamydospora* são favorecidas por temperaturas médias entre 7°C e 15°C e máximas entre 12°C e 18°C e pela ocorrência de precipitação que facilita o transporte de esporos e a contaminação das feridas de poda (Pinto, 2010; Larignon & Dubos, 2000).

Através de estudos numa vinha com esca, realizados por Larignon *et al.* (2000), comprovou-se a presença de esporos de *Pa. chlamydospora* ao nível dos talões de poda e, de esporos e micélio, no ritidoma dos sarmentos, durante todo o ano. Varas que se queiram utilizar para estacas podem constituir, assim, uma importante fonte de inóculo. De facto, material de propagação infetado considera-se um dos principais fatores de dispersão da doença (Fourie & Halleen, 2002).

2.5. Sintomatologia

Segundo Chicau (2006) os sintomas atribuíveis à doença de Petri incluem o atraso no desenvolvimento vegetativo das videiras, menor vigor, entrenós curtos, atempamento irregular nas varas, folhas com cloroses e necroses idênticas às causadas pela esca, desidratação de cachos e porta-enxertos, morte de enxertos prontos no ano subsequente à plantação e má cicatrização da enxertia.

Em corte transversal do lenho, visualizam-se pontuações castanhas (claras e/ou escuras) dispersas ou a formar um círculo em redor da medula (anel) (Fig. 2.2 A), com exsudação de goma, muitas vezes. Surico *et al.* (2008) não descreveram sintomas específicos na raiz. Com a doença de Petri pode ocorrer apoplexia (morte repentina), mas dá-se frequentemente o declínio lento com murchidão das folhas, morte de ramos e crescimento reduzido, podendo manifestar-se logo no primeiro ano de plantação (Bertelli *et al.*, 1998). A apoplexia caracteriza-se por “dieback” de um ou mais ramos, por queda de folhas e secagem dos frutos

(Mugnai *et al.*, 1999). Folhas saudáveis murcham e bagos secam completamente em poucos dias, geralmente com a ocorrência de tempo quente e seco após precipitação (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2006). Estas plantas podem então resumir o crescimento nessa ou na próxima estação ou, em último caso, morrer (Bertsch *et al.*, 2012).

Na Fig. 2.2 B observa-se crescimento reduzido de entrenós, folhas, troncos e ramos, que ficam também necróticos. Observam-se nas folhas manchas de coloração verde clara ou amarelada de dimensões irregulares entre as nervuras ou ao longo da margem da folha. Inicialmente, as áreas cloróticas são pequenas. Nas castas brancas, o tecido clorótico torna-se amarelo-acastanhado e nas tintas vermelho-acastanhado (Fig. 2.2 C).



Fig. 2.2 – Sintomas produzidos por *Phaeomoniella chlamydospora* em sarmentos, troncos e folhas de videira (Pinto, 2010).

Díaz e LaTorre *et al.* (2014) encontraram *Pa. chlamydospora* associada a estriamento negro da madeira semelhante a esca sem ocorrência de outros sintomas aparentes em videiras jovens ou adultas.

A evolução dos sintomas conduz ao aparecimento de um padrão denominado por 'listas de tigre' ou GLSD (Grapevine Leaf Stripe Disease) (Larignon & Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2001; Calzarano & Di Marco, 2007), que representam sintomas avançados típicos de esca. As cloroses foliares podem afetar apenas as folhas dum só ramo ou da planta inteira (Lecomte *et al.*, 2012). Estas normalmente aparecem vários anos após uma planta ter sido infetada e demonstrar sintomas na madeira (Bertsch *et al.*, 2013).

Na Fig. 2.3 A e B apresentam-se cortes transversais de videira exibindo pontuações castanhas (claras e/ou escuras) dispersas ou a formar um círculo em redor da medula (anel), com exsudação de goma. A Fig. 2.3 C e D apresentam um corte longitudinal de videira; as pontuações castanhas aparecem como estrias necróticas.

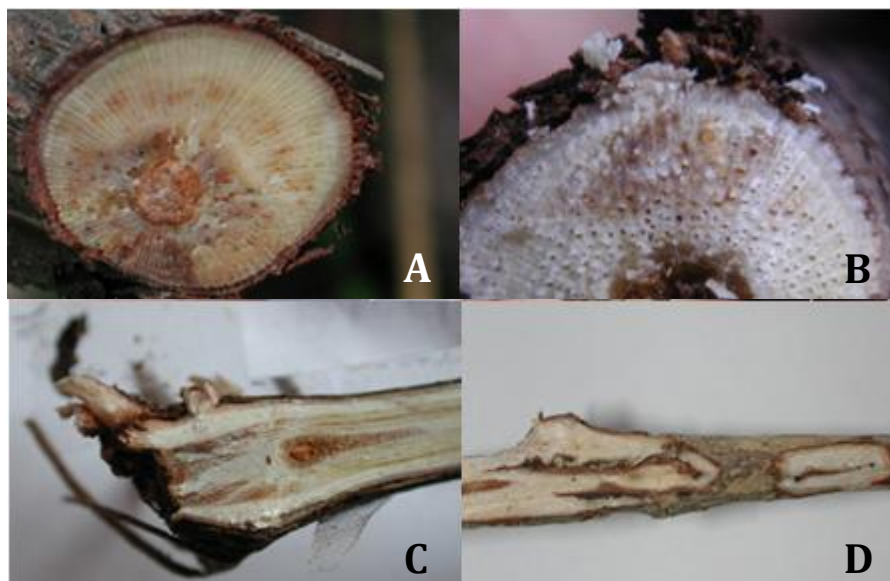


Fig. 2.3 - Cortes transversais (A e B) e longitudinais (C e D) de videira exibindo sintomas causados por *Phaeomoniella chlamydospora* (Alves e Almeida, 2010).

Nos bagos, podem aparecer pontuações negras a que se chama “black measles” ou sarampo preto, nome pelo qual chegou a ser conhecida a doença de Petri (Vasquez *et al.*, 2007, Mugnai *et al.*, 1999).

Internamente, os tecidos xilémicos enegrecem devido à acumulação de compostos fenólicos e formação de tiloses e gomas, fruto da resposta defensiva da planta (Mugnai *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2009). A inibição do fluxo de água e nutrientes resultam na formação das cloroses foliares e, segundo Fragoeiro (2001), na redução do crescimento das plantas. Segundo Bruno & Sparapano (2006), Chicau (2006) e Edwards *et al.* (2007c), em estações quentes, a elevada transpiração da planta resulta num rápido aumento da concentração destes compostos e diminuição da condutividade no xilema tendo como consequência a apoplexia.

Segundo Scheck *et al.* (1998(a)) e Rego *et al.* (2001) uma videira infetada com os fungos *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. ou com *Cylindrocarpon* spp., apresenta sintomas que são externamente idênticos. A Fig. 2.4 representa os sintomas que uma videira afetada por estes fungos pode exibir.



Fig. 2.4 - Sintomas de doença de Petri. (Chicau, 2006)

2.6. Patogénese

Como resposta à infeção as videiras produzem tiloses e gomas que bloqueiam os vasos (Troccoli *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2008), fornecendo barreiras mecânicas e bioquímicas que compartimentalizam a infeção e restringem a sua progressão. As tiloses são extrusões celulares formadas a partir das células do parênquima do xilema para dentro do lúmen dos vasos (Esau, 1977), enquanto as gomas são substâncias fluidas segregadas para dentro dos vasos a partir das células do parênquima (Rioux e Quellette, 1989; Rioux *et al.*, 1995). Num estudo efetuado por Mutawila *et al.* (2011b), onde se estudou o crescimento de *Trichoderma*, *P. chlamydospora* e *E. lata* em duas cultivares de videira, Cabernet Sauvignon e Sauvignon blanc, raramente se isolou *P. chlamydospora* da medula. Nos tratamentos com apenas um fungo, isolou-se, a partir do xilema, *P. chlamydospora* a 15mm até 90 dias após inoculação em Cabernet Sauvignon, enquanto em Sauvignon blanc, isolou-se até um máximo de 40mm de profundidade após 90 dias. Foram apenas encontradas hifas de *P. chlamydospora* e estas foram também observadas nos espaços intercelulares crescendo até mesmo em vasos bloqueados por gomas.

Apesar de o xilema ser principalmente tecido morto, a sua função como transportador de água e nutrientes a partir das raízes e a sua associação com células do parênquima paratraqueais permitem sustentar a colonização por *Phaeomoniella chlamydospora* (Mutawila *et al.*, 2011b), devido à sua função de armazenamento e como translocadoras de água e solutos a curtas distâncias (Oficina de Educação Científica, consultado a 13-03-2017). A presença de ferro no xilema altera a capacidade patogénica de *P. chlamydospora* devido à formação de radicais de hidroxilo que compensaram pela falta de atividade

enzimática específica por parte do fungo na degradação de celulose cristalina (Osti & Di Marco, 2010), explicando ainda melhor a sua preferência (Mutawila *et al.*, 2011b). Quanto maior a profundidade, menor a frequência de isolamento (Mutawila *et al.*, 2011b). As diferenças nas profundidades de isolamento podem ser atribuídas a variações na susceptibilidade a *P. chlamydospora* entre cultivares (Feliciano *et al.*, 2004). O mais rápido crescimento de *P. chlamydospora*, face a *E. lata*, em ramos com um ano, pode explicar a maior ocorrência de doença de Petri em videiras de viveiros, do que em madeira velha de videiras já estabelecidas (Mutawila *et al.*, 2011b). Resultados com fluorescência em *P. chlamydospora* por expressão da proteína fluorescente DsRed, mostraram crescimento hifal nos vasos secundários e no meta xilema, onde o fungo cresceu mais extensivamente do que nos espaços intercelulares. Crescimento hifal extensivo foi observado no lúmen, podendo contribuir para a obstrução xilema. Houve também aderência do micélio às paredes celulares podendo haver bloqueio do xilema nas aberturas entre vasos, com agravamento no bloqueio. Outros fatores, ainda não totalmente compreendidos, para além do bloqueio físico dos vasos, foram atribuídos à perda de função do xilema (Edwards *et al.*, 2007c). Apesar das células das paredes estarem mortas, a planta controla o transporte nestes vasos por meio de células associadas, sendo a comunicação entre as células associadas e as células mortas feita através de aberturas nas paredes dos vasos (Fromard *et al.*, 1995).

Foram isoladas enzimas capazes de degradar a parede celular (Marchi *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006), passíveis de ser utilizadas na penetração das membranas dos traqueídeos, durante o crescimento lateral das hifas dos fungos. Em vinhas micropropagadas com um ano de idade, verificou-se a penetração de *P. chlamydospora*. As enzimas envolvidas na decomposição da lenhina (lacases ou peroxidases da lenhina e manganês) parece não terem sido produzidas por *Pa. chlamydospora* (Santos *et al.*, 2006; Valtaud *et al.*, 2009). Assim, a penetração direta em madeira atempada (com maior composição em lenhina) parece menos provável, sendo o crescimento lateral feito mais regularmente pelo aparelho de transferência que conecta os vasos com as células vizinhas. Contudo, *Pa. chlamydospora* segrega pectinas permitindo-lhe colonização intercelular por degradação dos compostos pécticos da lamela média e da parede celular primária (Marchi *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006).

A oclusão dos vasos ocorreu por presença de hifas e uma coloração castanho avermelhada das células encontrou-se à volta dos vasos xilémicos. Esta coloração é provavelmente devida à acumulação de compostos produzidos por reação defensiva da planta formando uma barreira bioquímica ao crescimento do fungo (Weiner & Liese, 1995; Pearce, 1996). Comprovou-se que compostos fenólicos identificados como taninos condensados acumulam-se nas tiloses, gomas e células em torno dos vasos infetados (Amalfitano *et al.*, 2000; Del Rio *et al.*, 2001; Troccoli *et al.*, 2001). Amalfitano *et al.* (2000), extraíram níveis mais altos dos compostos fenólicos da madeira castanha-avermelhada do que de madeira saudável, identificando-os como resveratrol e viniferinas. Estes compostos possuem um efeito inibitório contra *Pa. chlamydospora* e outros patogêneos da vinha (Adrian *et al.* 1997; Santos *et al.*, 2006). Del Rio *et al.* (2004) descobriram que os compostos fenólicos produzidos pelas vinhas inibem a atividade das enzimas de espécies de *Phaeoacremonium* e *Eutypa lata*, contudo, *Phaemoniella chlamydospora* não segregou tais enzimas, ainda que estudos anteriores relatem inibição do crescimento *in vitro* por extratos de folhas contendo altos níveis de compostos fenólicos (Del rio *et al.*, 2001). A vinha já contém compostos fenólicos

(Amalfitano *et al.*, 2000), sendo que a maior concentração destes compostos em madeira infetada indica o papel destes na proteção da planta e resultam tanto da biossíntese dos mesmos ou translocação para os locais infetados (Troccoli *et al.*, 2001).

2.7. Métodos de Controlo

2.7.1. Luta Genética

Apesar de grandes esforços de melhoramento genético no sentido de obter variedades resistentes (Gray *et al.*, 2014), até ao momento, a obtenção de plantas resistentes não tem provado resultados satisfatórios, tornando-se prioritário diminuir as fontes de inóculo. Eskalen *et al.* (2001) testaram vários porta-enxertos não obtendo resultados positivos, apesar de serem observadas flutuações na susceptibilidade à doença.

2.7.2. Luta Cultural

A utilização de material saudável na vinha é a primeira medida a ser considerada na sua instalação (Gramaje & Armengol, 2011), isto porque, em vários viveiros, deteção por PCR demonstrou a presença de fungos causadores de doenças do lenho em tanques de hidratação, materiais vegetais e instrumentos de enxertia, turfas nas paletes e em água de poço (Larignon *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2013; Gramaje & Di Marco, 2015). A deteção antes da plantação é de extrema importância para assegurar a longevidade das vinhas (Úrbez-Torres *et al.*, 2015). Fertilizantes foliares baseados em cloreto de cálcio e algas de nitrato de magnésio parecem apresentar algum grau de controlo em videiras que apresentem sintomas de GLSD (Calzarano *et al.*, 2014).

Outras medidas incluem podas pouco severas e sistemas de condução que não necessitem de grandes intervenções à poda. Ainda que existam estudos que preconizam que esta deva ser efetuada o mais tarde possível para regenerarem mais depressa com as temperaturas elevadas e deve-se podar em primeiro lugar as cepas sãs para evitar a dispersão do fungo (Larignon *et al.*, 2000). Estudos recentes apontam, contudo, para reduções nas infeções naturais quando a poda é feita cedo (outono) (Luque *et al.*, 2014). Também já se conseguiram alguns resultados interessantes através do uso da poda dupla (Weber *et al.*, 2007), estes foram, contudo, em *Eutypa lata*. O sistema de condução, a técnica de poda e a colheita devem ser reconsiderados de modo a evitar feridas grandes causadas por poda mecânica, outras pequenas máquinas elétricas ou pela máquina de colheita (Fuente *et al.*, 2016). Sistemas de condução simplistas, no sentido de compensar a baixa densidade de videiras por hectare e também de adaptar a videira à poda mecânica e à colheita, estão na origem de muitos problemas associados a doenças do lenho, uma vez que se criam plantas com varas-guia simples que favorecem o desenvolvimento das doenças do lenho (Lecomte *et al.*, 2012).

Uma vez que, na natureza, a videira é uma planta com vários troncos a poda pode ser efetuada de forma a renovar a planta com crescimentos não infetados (Fuente *et al.*, 2016). É até possível criar videiras com vários troncos, tal como se faz em certas regiões com invernos severos (Estado de Nova York), nas quais se substituem os troncos danificados pelo frio e que, no caso das doenças do lenho, serviria para substituir

madeira afetada (Fuente *et al.*, 2016). Smart (2015) conseguiu o controlo da eutipiose substituindo o tronco afetado por ladrões saudáveis da base, resultados estes que podem ser usados como base para controlo de outras doenças do lenho. Esta técnica denomina-se por “Timely Trunk Renewal” ou “deixar uma espera”.

Recomenda-se a remoção e queima das cepas mortas e tecidos doentes da poda (Aboim-Inglez *et al.*, 2004). A lenha de poda infetada pode ser compostada e novamente introduzida (Lecomte *et al.*, 2006). Deve-se considerar a proteção de feridas de poda com plásticos, mastique, óleos, etc., restaurar ramos mortos e, em último caso, substituir a planta toda (resolução OIV VITI 2/2006). Devem ser removidos restos de madeira infetados do solo para reduzir a carga de inóculo (resolução VITI 2/2006 OIV) e tidas em conta práticas de desinfestação e correção do solo, bem como a utilização de plantas mais resistentes (Travadon *et al.*, 2015).

Apesar de a pesquisa por clones e variedades resistentes ser necessária já existem cultivares naturalmente mais tolerantes a doenças do lenho do que outras, como é o caso da casta Merlot (Pouzoulet & Rolshausen, 2014; Travadon *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2015). Em Itália, Quaglia *et al.* (2009), verificaram maior incidência de esca nas cultivares Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano toscano e menor em Montepulciano e Merlot. Esta suscetibilidade depende, algumas vezes, do porta-enxerto tais como diferenças relativas ao seu conteúdo em poliamina livre (Fuente *et al.*, 2016). Gramaje *et al.* (2010) sugerem que cruzamentos entre porta-enxertos de *V. riparia* x *V. berlandieri* poderão ser os menos suscetíveis a patógenos da doença de Petri.

Ainda carecendo de estudos na matéria, existe a alternativa de aplicação de fitofortalecedores ou produtos de extratos vegetais (Chollet *et al.*, 2014). Mas produtos como 2-hidroxibenzóico têm um efeito promissor contra Esca, por estimular os mecanismos de defesa da planta (Sentenac *et al.*, 2004).

Cobos *et al.* (2015) mostraram oligossacárido de quitosana, vanilina e extrato de alho têm maior eficácia *in vitro*, quando testados em ensaios de madeira autoclavada contra *Pa. chlamydospora*. Em ensaios de campo, observou-se uma diminuição significativa na mortalidade de plantas após 2 anos de crescimento em feridas de poda inoculadas de plantas tratadas em comparação com plantas não tratadas.

2.7.3. Luta Física

Como medida preventiva pode efetuar-se o tratamento de material de propagação com água quente. Segundo Crous *et al.* (2001), colocam-se as plantas durante 30 minutos a 50°C, antes da enxertia, para reduzir o número de esporos viáveis. Gramaje *et al.* (2009a) com um tratamento a 53°C durante 30 minutos conseguiram erradicar *Pa. chlamydospora* e reduzir bastante *Pm. aleophilum*. Bastam 45°C a 47°C para eliminar *Pa. chlamydospora*, mas temperaturas de 53°C eliminam outros patógenos mais resistentes que os da doença de Petri (Bertsch *et al.*, 2013). Outros estudos com temperaturas de 53°C durante 45 minutos confirmam a possibilidade de controlar fungos da doença de Petri e pé negro através de tratamentos com água quente (Gramaje & Armengol, 2011; Agustí-Brisach & Armengol, 2013). Ainda assim, há que atentar na proveniência do material uma vez que material produzido em países mais frios

poderá ser susceptível a elevadas temperaturas (Crocker *et al.*, 2002; Graham, 2007; Gramaje *et al.*, 2008). Este tratamento pode contudo causar stresse na planta e perda de qualidade (Waite & Morton, 2007). É de salientar que o efeito do tratamento com água quente é temporário dado que os materiais podem ser contaminados posteriormente.

2.7.4. Luta Biológica

Estudos feitos por Pertot *et al.* (2016) confirmam o sucesso no uso de *Trichoderma atroviridae* SC1 quando aplicada nos tanques de hidratação (o mais eficiente), calogénese e pré-plantação para controlo de infeções por *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*. Não se tendo perdido a viabilidade dos conídios de *T. atroviridae* SC1, usados para embeber os enxertos de videira, mesmo após 72 horas e a temperaturas entre 5°C e 15°C. Foi até possível utilizar a suspensão até 4 vezes nas primeiras 48 horas sem perda de viabilidade, constituindo assim esta uma forma de controlo em viveiros.

Mutawila *et al.* (2011a) testaram oito cultivares de videira para vinificação e quatro para uva de mesa juntamente com duas estirpes de *Trichoderma atroviride* e uma de *T. harzianum*. Os patógenos do lenho identificados foram *Phaeomoniella chlamydospora* e fungos dos géneros *Phaeoacremonium*, *Phomopsis*, *Botryosphaeriaceae* and *Diatrypaceae*. A incidência dos patógenos foi de 10.3% em Chardonnay até 66.7% em Chenin blanc. Houve correlação entre a incidência de *Trichoderma* sp. e a redução de patógenos, excetuando em cinco cultivares o que levou a concluir que o efeito supressivo dos patógenos não era o único fator mas também a interação cultivar-*Trichoderma* sp. Segundo Di Marco *et al.* (2004), Fourie & Halleen (2006), Di Marco & Osti (2007), houve redução do estriamento vascular em ramos de videiras de viveiro inoculados com *T. harzianum*. As espécies de *Trichoderma* são eficazes no controlo biológico devido ao seu rápido crescimento, elevada capacidade reprodutiva e propriedades antagonistas que lhes permitem competir com sucesso com outros microrganismos (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991; Harman *et al.*, 2004). Contudo, pouco se sabe sobre a interação entre *Trichoderma* e as doenças do lenho em feridas de poda (Mutawila *et al.*, 2011b) e ainda se carece de estudos sobre a interação *Trichoderma*-cultivar de videira. Sabe-se que as espécies de *Trichoderma* segregam quitinase e glucanase, enzimas que degradam a quitina e β -glucanos, polisacarídeos estes que mantêm a integridade das paredes celulares dos patógenos (Lorito, 1998; Howell, 2003; Woo & Lorito, 2007). Noutros estudos, Mackenzie *et al.* (2000), Fourie *et al.* (2001) e Bertsch *et al.* (2013) referem que *Trichoderma* sp. promove o crescimento radicular da videira, proporcionando maior tolerância das plantas ao stresse. Estes microrganismos conseguem crescer em meios altamente competitivos como o solo, tornando-os fungos de escolha para controlo biológico (Harman *et al.*, 2004).

A estirpe AG1 da bactéria *Bacillus subtilis* também parece ter demonstrado possível aplicação no controlo de doenças do lenho provocadas por *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora* (Alfonzo *et al.*, 2009). Diz-se possível porque este foi um ensaio *in vitro* no qual se testou o antagonismo de substâncias produzidas pela bactéria contra o crescimento micelial dos fungos, incluindo *Verticillium dahliae* e *Botryosphaeria rhodina*.

Outros organismos como *Fusarium lateritium*, *Erwinia herbicola*, *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* e *Rhodotorula rubra* comprovou-se serem eficazes na redução de doenças do lenho da videira, extremes ou em combinação com fungicidas, contudo alguns necessitam de ser testados no campo (Bertsch *et al.*, 2013).

É também possível a indução dos sistemas de defesa da videira usando oomicetas contra Esca, ocorrendo redução de 50% nas necroses quando usado *Pythium oligandrum* para colonizar o sistema radicular de videiras da variedade Cabernet Sauvignon (Gerbore, 2013; Yacoub *et al.*, 2014, Yacoub *et al.*, 2016).

A acumulação de proteínas produzidas como resposta à patogénese constitui outro dos mecanismos de defesa induzíveis. A expressão destas proteínas é regulada pelas folhas de plantas afetadas, estando atividade fungitóxica associada a proteínas como osmotina, taumatina, peroxidase aniónica, quitinase, β -1,3-glucanase e proteínas desativadores de ribossomas (Bertsch *et al.*, 2013).

2.7.5. Luta Química

Estando proibido o uso de arsenito de sódio mundialmente e há vários anos, por questões toxicológicas, carcinogénicas e efeitos nefastos para o ambiente, o mercado requer, novos pesticidas em consequência do aumento da incidência de doenças do lenho da videira (Pinto, 2010).

Produtos com resultados comparáveis aos do arsenito ainda não foram descobertos, contudo vários produtos eficazes têm sido testados ao longo dos anos, ainda assim, em termos de eficiência, os resultados são variáveis. O problema reside, entre outros fatores, no facto de, em viveiros, existirem poucos produtos registados, estes não oferecerem proteção prolongada ou elevado espectro de ação (Gramaje & Armengol, 2011). Aliado a estes factos, acontece que nos vários ensaios levados a cabo pelo mundo, os produtos não são eficientes, com resultados duradouros ou a sua aplicação prática, estando vários fatores em ação como o método e número de aplicações, o espectro de ação e a espécie de fungo em questão (Bertsch *et al.*, 2013).

Santos *et al.* (2006), em estudos de comparação entre tiabendazol, resveratrol e arsenito de sódio, comprovaram que, ao contrário deste último pesticida, os dois primeiros reduziam o crescimento micelial de *Pa. chlamydospora* e com níveis de toxicidade muito inferiores. O resveratrol é uma fitoalexina produzida naturalmente por várias plantas em resposta a lesões causadas por fungos ou bactérias (Fremont, 2000) e encontrada no pericarpo das uvas como resposta a ataques de *Botrytis cinerea* sob a forma de *trans*-resveratrol (Favaron *et al.*, 2009).

Em Itália demonstrou-se a eficácia do fosetil de alumínio em relação a ambos os fungos da esca jovem, *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* (Di Marco *et al.* 2000).

Na Nova-Zelândia, Jaspers (2001), comprovou a eficiência *in vitro* de ciproconazol (Alto 100SL), bitertanol (Baycor 300EC), tebuconazol (Folicur 430SC), fenarimol (grau técnico), miclobutanil (Systhane 40W) e procloraz (Sportak EW) na inibição do crescimento micelial de *Pa. chlamydospora* com valores de EC₅₀ mais baixos. Contudo, na germinação de esporos apenas o benomil (Benlate) e as anilino pirimidinas

(ciprodinil/fludioxonil (60:40) (Switch), extremes ou combinadas com fenilpirrol, tiveram os EC₅₀ mais baixos (0.09 mg.L⁻¹, 0.086 mg.L⁻¹ e 0.11 mg.L⁻¹, respectivamente). Para este último efeito os fungicidas de contacto revelaram-se os mais eficazes, contudo para a inibição do crescimento micelial revelaram-se muito pouco eficaz. O sulfato de hidroxiquinolina (Chinosol W) revelou-se interessante apenas na redução da germinação conidial (EC₅₀ 0.002 e 8.5 mg.L⁻¹, respectivamente). O cresoxime-metilo (Stroby WG) revelou-se eficiente na inibição de crescimento micelial e na germinação com valores de EC₅₀ de 0.086 e 0.11 mg.L⁻¹, respetivamente. Estes resultados devem ser considerados tendo em conta que os testes de EC₅₀ são efetuados com o produto comercial e não com a substância ativa, sendo que podem existir vários produtos no mercado com a mesma substância ativa a diferentes concentrações.

Em Portugal, testou-se tolifluanida, trifloxistrobina, tebuconazol e azoxistrobina na inibição do crescimento micelial de *Pa. chlamydospora*, tendo sido obtidos os melhores resultados para o primeiro e terceiro fungicidas (Lourenço, 2001).

Laukart *et al.* (2001) avaliaram oito substâncias ativas relativamente à redução de necroses causadas por *Pa. chlamydospora* e concluíram que o fosfanato foi a mais eficiente e o benzotiadiazol o menos eficiente.

Noutros estudos realizados *in vitro* com quitosana, atingiu-se uma inibição total do crescimento de *Pa. chlamydospora* a uma concentração de 50 mg.L⁻¹ (Bruno *et al.*, 2001) ou de 25 mg.L⁻¹ (Nascimento *et al.*, 2007), o que provou a sua possível importância no controlo deste fungo. Esta substância é um polímero não tóxico, biocompatível e biodegradável, que tem apresentado actividade antifúngica e antibacteriana, para além de ser um activador de mecanismos de defesa nas plantas (Bell *et al.*, 1998; Sathiyabama & Balasubramanian, 1998; Bautista-Baños *et al.*, 2003; Ait Barke *et al.*, 2004). Diversos fatores influenciam a eficiência da quitosana tais como o grau de desacetilação da quitina (substância a partir da qual a quitosana é obtida), do peso molecular e do pH do meio de cultura (Alfredsen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Torr *et al.*, 2005).

Estudo realizados *in vivo*, em estufa de campo com pulverização foliar, demonstraram a redução na incidência de *Pa. chlamydospora*, facto que reforça a possibilidade da sua utilização como substância alternativa (Nascimento *et al.*, 2007).

Em viveiros, foi possível o tratamento da água no processo de hidratação com ozono para descontaminação como processo complementar, sendo que Pierron *et al.* (2015) conseguiram resultados na redução de infeções por *Pm. aleophilum*. Contudo, em estudos anteriores, outros autores chegaram a resultados inconclusivos (Mailhac *et al.*, 2010) e outros mesmo a defender que, em viveiros, este método não controlou os fungos (Vigues *et al.*, 2010).

Foi utilizada, com sucesso, água eletrolizada acídica no processo de hidratação após o armazenamento a frio para controlo de *Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora*, mostrando a sua eficiência na redução da germinação conidial sem afetar o crescimento das plantas e desenvolvimento em campo (Di Marco & Osti, 2009).

Cobos *et al.* (2015) mostraram a eficácia da quitosana, vanilina e extrato de alho contra *Pa. chlamydospora* e *D. seriata* (fungo da família Botryosphaeriaceae) em ensaios de madeira de videira autoclavada. Observou-se um decréscimo de mortalidade nas plantas após dois anos de crescimento em feridas de poda inoculadas tratadas quando comparadas com as não tratadas.

Ainda assim, existem grandes restrições ao nível do bitertanol que apenas se encontra autorizado em Portugal e Holanda. O fenarimol e a tolifluanida não parecem estar autorizados em nenhum país da Europa. Quanto ao fenilpirrol e ao fosfanato não foi encontrada informação na base de dados de pesticidas da Comissão Europeia e a quitosana parece permitida, mas sem informação discriminada a nível nacional. O sulfato de hidroxiquinolina encontra-se com estatuto de aprovado, contudo, não foi encontrada discriminação da autorização a níveis nacionais. O benzotiadiazol encontra-se autorizado em apenas 9 países incluindo Portugal.

3. Doenças do lenho causadas por *Neofusicoccum parvum*

3.1. Agentes causais

O primeiro caso de estudo associado às botriosferioses começou com Ravaz e Verge (1925) que designaram de escoriose europeia a doença que observaram em videiras sintomáticas. Atribuíram os sintomas observados a *Phoma flaccida* Viala & Ravaz. Desde então, relatos, sob o nome de *Macrophoma flaccida* (Viala & Ravaz) Cavara, surgiram na África do Sul (Doidge *et al.*, 1953), França (Gaudineau, 1961), Grécia (Pantidou, 1973) e Portugal (Dias e Lucas, 1980; Tomaz e Rego, 1990).

Nos EUA, associava-se *P. viticola* a outra doença, a escoriose americana (Bugaret, 1987; Hewitt e Pearson, 1988). O facto de nunca terem sido testados os postulados de Koch para *M. flaccida* e a existência de relatos de *P. viticola* na Alemanha pôs em causa a patogenicidade da primeira (Claus, 1965; Thate, 1965), seguidos da mesma conclusão por vários autores (Branas, 1967; Bugaret, 1987, Dias, 1980) e que era causada por *P. viticola* (Dias, 1980). Contudo, Tomaz e Rego (1990) identificaram com frequência *M. flaccida* em várias vinhas com sintomas de excoriose, tendo, em 1997, sido identificada como sinónimo de *Fusicoccum aesculi*, o anamorfo de *Botryosphaeria dothidea* (Phillips e Lucas, 1997), espécie da família Botryosphaeriaceae.

Phillips (2000b) esclareceu o estado do conhecimento sobre a doença, bem como quais os patogéneos associados. Um estudo de campo, por várias vinhas de Portugal com sintomas de escoriose, referiu *B. dothidea* como sendo a espécie mais dominante, seguida, entre outras, de *P. viticola*, *Diplodia seriata* e *Diplodia mutila* (Phillips, 1998), sendo as duas últimas espécies referidas também exemplos dentro da família Botryosphaeriaceae. Testes de patogenicidade revelaram ambas *B. dothidea* e *P. viticola* como sendo patogénicas em ramos feridos ou não (Úrbez-Torres, 2011), tendo sido reproduzidos sintomas em ambos os tipos de ramos quando inoculados com isolados de *B. dothidea* (Phillips, 1998). Este estudo referido constituiu forte evidência para a associação de *B. dothidea* a escoriose segundo Úrbez-Torres (2011). Com base nos estudos (Phillips e Lucas, 1997; Phillips, 1998; Phillips, 2000b), seria de concluir que a excoriose é causada por *B. dothidea* e não por *P. viticola*, que é por sua vez o agente causal de “leaf and cane spot” ou excoriose americana, doença diferente, como estabelecido por Hewitt e Pearson (1988). Contudo, estudos anteriores com referência a *B. dothidea*, antes do uso de dados de sequência de genes para clarificar a definição desta e mais espécies dentro do género (e.g. Phillips *et al.* 2002, Slippers *et al.*, 2004a), passaram a ser considerados dúbios (Phillips *et al.*, 2013). *B. dothidea* também já foi considerada como sendo *B. ribis*, nos estudos (Witcher e Clayton, 1963; Barr, 1972; Pennycook & Samuels, 1985; Brown & Britton, 1986; Smith *et al.*, 1994), e *N. mediterraneum* noutros estudos segundo (Úrbez-Torres, 2011).

Várias outras espécies dentro da família Botryosphaeriaceae têm vindo a ser identificadas dentro da família, tendo, ao mesmo tempo, sido isoladas de videira. Estas espécies foram *Dothiorella americana*, *Dothiorella ibérica*, *Dothiorella vidmadera*, *Dothiorella sarmentorum*, *Lasiodiplodia crassispota*, *Diplodia corticola*, *Lasiodiplodia missouriana*, *Lasiodiplodia plurivora*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia*

viticola, *Neofusicoccum australis*, *Neofusicoccum luteum*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Neofusicoccum viticlavatum*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Neofusicoccum ribis*, *Dothiorella viticola*, *Sphaeropsis porosa*. De notar que nem todas as espécies referidas foram isoladas de plantas sintomáticas, permanecendo os estudos sobre essas limitados.

3.1.1. Taxonomia

Dentro do Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Botryosphaeriales, encontramos a família Botryosphaeriaceae (MycoBank, www.mycobank.org, novembro 2016). Estes fungos são causadores de doenças com variados sintomas em videira, resultando em perdas económicas graves no setor da viticultura. A identificação destes fungos tem sido um processo complexo, caracterizado por um grande esforço por parte da comunidade científica no sentido de atingir um consenso.

Existem poucas características diferenciadoras das diferentes espécies da família Botryosphaeriaceae. Isto complica a sua taxonomia, que se baseia fundamentalmente nos anamorfos já que os teleomorfos raramente se formam em cultura artificial ou se detetam na natureza (Denman *et al.*, 2000). Aliado à indistinta morfologia entre espécies próximas (van Niekerk *et al.*, 2006) existe acentuada variabilidade intraespecífica (Luque *et al.*, 2005).

Para a realização da sua taxonomia conjugam-se dados de natureza morfológica com técnicas moleculares (baseadas em PCR e sequenciação de DNA). Com estas técnicas reclassificaram-se algumas espécies (Phillips, 2002, van Niekerk *et al.*, 2004, Slippers *et al.*, 2004a) e descreveram-se novos géneros e espécies (Phillips, 2002, Slippers *et al.*, 2004a), contudo, continuam as dificuldades na sua identificação (van Niekerk *et al.*, 2006). Assim, o diagnóstico e deteção em campo, por observação de sintomas vasculares e internos, também se afiguram difíceis (Úrbez-Torres, 2011). *Botryosphaeria* tornou-se relevante devido à elevada variabilidade de virulência observada entre diferentes espécies (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres e Gubler, 2009).

A identificação por cultura em placas é restritiva e consumidora de tempo (Spagnolo *et al.*, 2011) levando 2-3 semanas a obter resultados, em comparação com técnicas baseadas em PCR que demoram apenas um dia (Úrbez-Torres, 2011), contudo permite avaliar a viabilidade dos isolados.

Ao fim de 3 dias, em PDA e na obscuridade, as colónias de *N. parvum* caracterizam-se por micélio cotonoso e ligeiramente acastanhado na face inferior (Fig. 3.1). Ao fim de 7 dias o micélio adquire um aspeto cotonoso e de cor branca nas margens e, no centro, uma coloração castanha clara. Aos 30 dias a colónia apresenta-se cinzenta escura e acastanhada e sem produção de picnídios (Amponsah *et al.*, 2011).



Fig. 3.1 – Morfologia da cultura de *Neofusicoccum parvum* 3 dias após crescimento em PDA, a 25°C e na obscuridade (Amponsah *et al.*, 2011).

Apesar da precisão e rapidez dos métodos moleculares de identificação uni-*locus* comparativamente a métodos baseados na morfologia, nem todos os aspetos taxonómicos ficaram resolvidos na família Botryosphaeriaceae. *N. parvum* e *N. ribis*, muitas vezes confundidas com *B. dothidea*, são espécies bastante próximas formando aquilo a que se denomina o complexo *N. parvum/N. ribis*. Estas espécies têm sido difíceis de diferenciar devido a características morfológicas semelhantes e por sequências ITS idênticas (Zhou *et al.*, 2001). Contudo, identificação por ISSR (Zhou *et al.*, 2001) permite esta diferenciação.

Após a introdução de estudos moleculares, os diferentes táxones identificados dentro do género *Botryosphaeria* Cesari & De Notaris foram colocados como teleomorfos do género *Diplodia* Fr. (conídios maioritariamente ovóides, corados e de parede espessa) ou *Fusicoccum* Corda (conídios fusiformes, hialinos e de parede espessa) (Úrbez-Torres, 2011). Contudo, vários desses anamorfos possuem características intermédias e existem outros fungos com anamorfos semelhantes a *Diplodia* e *Fusicoccum* cujo teleomorfo se encontra fora do género *Botryosphaeria* (Vaz, 2008) e o estatuto de *Lasiodiplodia* Ellis & Everh não havia sido resolvido (Úrbez-Torres, 2011).

Crous *et al.* (2006) definiram 10 linhagens dentro da família Botryosphaeriaceae. Contudo, o conjunto de dados utilizados não definiu o estatuto do grupo *Diplodia/Lasiodiplodia*. Phillips *et al.* (2008) tentaram definir a taxonomia de espécies de Botryosphaeriaceae com ascósporos pigmentados definindo seis clades no complexo *Diplodia/Lasiodiplodia* e quatro adicionais clades em Botryosphaeriaceae. Liu *et al.* (2012), mas principalmente Slippers *et al.* (2013) e Phillips *et al.* (2013) ofereceram uma atualização da classificação de Botryosphaeriales com base em ambas características morfológicas e moleculares, tendo ficados definidos 17 géneros dentro de Botryosphaeriaceae. De entre estes, encontramos o género *Neofusicoccum* e, assim, a espécie *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, Basionym: *Fusicoccum parvum* Pennycook & Samuels.

Apesar de estes autores fazerem uma distinção entre a designação atribuída ao teleomorfo e ao anamorfo, no novo Código Internacional de nomenclatura para algas, fungos e plantas (Código Melbourne) esta distinção encontra-se obsoleta. Ambas as designações estão corretas independentemente do estado que tipificavam (anamorfo/teleomorfo) quando foram atribuídas, desde que respeitem o artigo 52 do Código Melbourne, mas futuras descobertas de espécies de fungos apenas deverão atribuir uma única designação.

Segundo Crous e Palm (1999) e Phillips (2002), o elevado número de sinonímias existentes é devido ao facto de terem sido feitas inúmeras identificações de espécies quando a definição destas ainda não era clara.

Segundo van Niekerk *et al.* (2004) testou-se a patogenicidade de 12 espécies de Botryosphaeriaceae em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Nos ensaios *in vitro*, em madeira excisada jovem, definiram-se *N. australe* e *N. parvum*, e *D. seriata* e *Phaeobotryosphaeria porosa*, como sendo as mais e menos virulentas, respetivamente. Em madeira excisada madura, *N. ribis* e *N. australe*, e *N. luteum* e *L. theobromae* foram as mais e menos virulentas, respetivamente. Nos ensaios *in vivo*, em madeira de videiras em campo, *L. theobromae*, *N. australe*, *N. parvum*, e *Phaeobotryosphaeria porosa* foram as mais virulentas. Os sintomas observados foram semelhantes em ambos os tipos de ensaios, estrias negras na madeira. Os resultados devem, contudo, ser considerados tendo em conta que não reproduziam as condições de campo e favoreciam o crescimento do fungo e, para os *in vivo*, não foram testados múltiplos isolados de cada espécie. Nos EUA, Úrbez-Torres e Gubler (2009) realizaram um estudo com 72 isolados, totalizando 9 espécies de Botryosphaeriaceae, inoculadas em 5 diferentes tipos de tecidos de diferentes cultivares, através de micélio e suspensão de esporos e submetidas a períodos de incubação entre 6 e 24 meses. O resultado foi que todas as espécies infetaram tanto ramos jovens como maduros, causando faixas negras ou, por outro lado, necroses e descoloração vascular, variando, mais uma vez, a virulência intra e interespecies. *L. theobromae* confirmou-se como a mais violenta seguida por *N. luteum*, *N. parvum* e *N. australe*. *B. dothidea*, *D. mutila* e *D. seriata* consideraram-se medianamente virulentas, e *D. iberica* e *S. viticola* as menos. As quatro mais virulentas referidas colonizaram três vezes mais rápido a madeira quando comparadas com *E. lata*. Luque *et al.* (2009) confirmaram os mesmos resultados para *N. parvum*, *N. luteum*, *B. dothidea* e *D. seriata* em Espanha. Outros estudos nos EUA confirmaram a elevada patogenicidade de *L. theobromae* e *N. parvum* adicionando *D. corticola*, *L. crassispota*, *L. missouriana*, *L. viticola*, *N. mediterraneum* e *N. ribis* como patogéneos importantes (Úrbez-Torres *et al.*, 2009; Úrbez-Torres *et al.* 2010b; Úrbez-Torres *et al.*, 2010c; Úrbez-Torres *et al.*, 2011). Assim, *Neofusicoccum* spp. encontram-se entre as mais virulentas dentro da família Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres, 2011).

3.1.2. Distribuição geográfica

As regiões aonde *N. parvum* foi encontrada incluem Austrália, EUA (Califórnia), Chile, China, Etiópia, EUA (Florida), EUA (Geórgia), Grécia, EUA (Havai), Irão, Itália, México, Nova Zelândia, Peru, Portugal, África do Sul, Espanha, Taiwan, Uganda, Venezuela e, provavelmente, uma distribuição já mundial (Phillips *et al.*, 2013). As diferenças na distribuição geográfica entre as espécies de Botryosphaeriaceae são maioritariamente devidas a fatores climáticos (Leavitt, 1990; Taylor *et al.*, 2005; van Niekerk *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2006a; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Pitt *et al.*, 2010). Em climas, como Canadá (Chamberlain *et al.*, 1964; O’Gorman *et al.*, 2010) e Nordeste dos EUA (Úrbez-Torres *et al.*, 2007b; Rolshausen e Wilcox, 2009), *B. dothidea* e *N. parvum* foram as mais abundantes entre as espécies da família Botryosphaeriaceae.

Juntamente com *B. obtusa*, também se pôde associar ao Black Dead Arm (BDA), em França, *N. parvum* (Larignon, 1999, Larignon & Dubos, 2001, Larignon *et al.*, 2001).

Em 2006, associaram-se, por Úrbez-Torres *et al.*, as espécies *B. rhodina*, *B. obtusa*, *B. stevensii*, *N. parvum*, *B. australis*, *B. viticola*, *B. dothidea* e *B. ribis* a necroses (“cankers”), formados em ramos de videiras, nos Estados Unidos.

Bester *et al.* (2007) referem *B. obtusa*, *N. australe*, *N. parvum* e *L. theobromae* como as mais comuns encontradas na África do Sul.

Noutro estudo com uvas de mesa também na África do Sul, mostrou-se que *B. obtusa*, *N. parvum* e *Lasiodiplodia theobromae* eram as espécies mais frequentes de Botryosphaeriaceae, com a sua incidência, em regiões de clima diferente, variando entre prevalente a ausente (Bester, 2006; Bester *et al.*, 2006).

Em Portugal, foram, normalmente, detetadas três espécies. *B. obtusa*, *N. parvum*, e *B. lutea*, encontraram-se associadas a “dieback” do tronco, necrose da madeira, faixas castanhas na madeira, branqueamento de varas ou de enxertos incompletos. *N. parvum* foi a mais comum e amplamente distribuída Phillips (2002).

Haleem *et al.* (2011) relataram *N. parvum* pela primeira vez no Iraque associada a declínio das videiras.

No Quadro 3.1 são sumarizadas regiões aonde foram encontradas espécies de Botryosphaeriaceae e qual o sintoma associado.

Quadro 3.1 – Sintomas em videira a partir dos quais *N. parvum* foi isolada e regiões do mundo associadas. (Adaptado de Úrbez-Torres, 2011).

Espécie	NC	ENM	DV	BV	NM	NR	NG	EF
<i>N. parvum</i>	AUS, CAN, ESP, ITA ¹ NZL, PRT,USA, ZAF,	ESP, ITA ¹ PRT, USA	IRA	PRT	ESP	USA	NZL,PRT	NZL, PRT

NC - Necrose em forma de cunha; ENM – Estriamento negro da madeira; DV - Declínio de videiras; BV - Branqueamento de varas; NM - Necrose da medula/ em torno da medula; NR - Necrose radicular; NG - Necrose de gomos; EF - Enxertias fracassadas;

AUS – Austrália; CAN – Canada; ESP – Espanha; IRA – Iraque; ITA – Itália; NZL – Nova Zelândia; PRT – Portugal; USA – Estados Unidos da América; ZAF – África do Sul;

Referências: ¹Mondello *et al.*, 2013

3.2. Biologia

Devido a factores como variedade de espécies, distintos sintomas que provocam, associação entre estas, bem como com outros patógenos do lenho, existe ainda pouca informação sobre a biologia deste fungo.

3.2.1. Fontes de inóculo

A presença em campo de material de poda infetado ou frutificações do fungo nos órgãos da planta são consideradas as principais fontes (Úrbez-Torres, 2011). Contudo, os materiais de propagação podem já vir infetados do viveiro quer sejam enxertos prontos (Rego *et al.*, 2001, Fourie & Halleen, 2002) ou dos componentes (Oliveira *et al.*, 2007). Os fungos mais isolados de material de propagação incluem *D. seriata* (Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2010) e *N. parvum* (Aroca *et al.*, 2010).

Sabe-se que várias espécies da família Botryosphaeriaceae são plurívoras ocorrendo em espécies vegetais da flora nativa ou introduzida, ou mesmo de outras culturas agrícolas (Farr & Rossman, 2011). Assim, a flora presente numa vinha pode, potencialmente, funcionar como fonte de inóculo via frutificações do fungo (Úrbez-Torres, 2011). Contudo, apenas van Niekerk *et al.* (2004) apoiaram esta teoria demonstrando a elevada virulência, em vinha, de um isolado de *N. ribis* proveniente de *Ribes* sp. Assim, esta matéria continua a carecer estudos (Úrbez-Torres, 2011).

3.2.2. Vias de penetração

Os fungos encontram-se inicialmente sob a forma de picnídios (estrutura reprodutora assexuada), contendo conídios (Brodo *et al.*, 2001), que são negros por fora e hialinos por dentro quando abertos (Bush, 2009), ou, em certos casos, pseudotecas (estruturas sexuadas, que contêm ascos com ascósporos (Phillips, 1998) em materiais de poda abandonados ou em órgãos da planta previamente atacados como no ritidoma esbranquiçado de lançamentos ou em cancrios (Gubler *et al.*, 2005).

Os picnídios produzem e libertam conídios ao longo da época de crescimento da videira (a partir da primavera) (Pitt *et al.*, 2012). A quantidade inicial de inóculo próxima a feridas de poda constitui assim um fator de risco (Fourie & Halleen, 2004, Halleen & Fourie, 2005). Segundo Vaz (2008), não estava explicada totalmente a interveniência das pseudotecas no ciclo da doença, contudo, Pitt *et al.* (2012) referem a sua formação no exterior de cancrios e produção ascósporos, e a sua entrada na planta por feridas de poda recentes. O crescimento do fungo dentro da planta dá-se através de micélio proveniente da germinação dos esporos.

Segundo Copes & Hendrix (2004), comprovou-se que as condições ótimas de infeção são muito variáveis e, segundo Larignon & Dubos (2001), estas, juntamente com o modo como a penetração na planta ocorre, também não foram esclarecidas. Contudo, segundo Pitt *et al.* (2012), sabe-se que a invasão da planta ocorre via vasos xilémicos e danificando o sistema vascular, sendo a principal porta de entrada feridas em madeira com 1 ano de idade (van Niekerk *et al.*, 2006). Formam-se cancrios à volta da zona inicial de infeção (Pitt *et al.*, 2012). Danos ao sistema vascular provocam necrose da madeira e “dieback” (Pitt *et al.*, 2012).

3.2.3. Feridas de poda

Serra *et al.* (2008), publicaram um estudo efetuado durante três consecutivas épocas de dormência, avaliando a suscetibilidade das feridas de poda todas as semanas até 4 meses após a poda em janeiro, fevereiro e em março. Apesar de a suscetibilidade das feridas de poda ter decrescido com o tempo em 2 das 3 épocas de dormência, verificou-se que aquela se manteve elevada até 4 meses após a poda. Ocorrendo inclusive até mesmo à primavera tardia, quando as feridas libertam seiva. Verificou-se que estas eram mais suscetíveis quando podadas em março do que em janeiro. Noutro estudo por Úrbez-Torres e Gubler (2011), na Califórnia, tendo sido avaliadas duas cultivares diferentes, desde novembro a março, até 84 dias após a poda, os resultados foram diferentes, sendo que a suscetibilidade a infeções por *L. theobromae* e *N. parvum* (quando inoculados logo após a poda) foi menor em março quando comparada com podas em novembro, dezembro, janeiro e fevereiro. Este estudo também demonstrou uma correlação positiva entre diminuição da suscetibilidade das feridas e aumento de temperatura em janeiro e fevereiro, estando este último facto bem documentado noutros estudos (Bostock e Stermer, 1989). Úrbez-Torres e Gubler (2011), também mostraram que não existe diferença de susceptibilidade entre lançamentos com um e dois anos de idade. Contudo, o uso de diferentes cultivares, em condições ambientais diferentes, e o facto de as inoculações terem sido artificiais, causando um possível excesso de “pressão de inóculo”, constituem fatores que podem explicar as diferenças entre resultados obtidos (Úrbez-Torres, 2011).

Ainda no que respeita à poda, segundo Pitt *et al.* (2012), esta deve ser efectuada o mais tarde possível, sob tempo seco, para que os cortes fiquem o mais verticais possível. Podas tardias permitem regeneração mais rápida das feridas, contudo, em vinhas maiores, nas quais isto pode ser difícil, podas temporãs podem ser viáveis devido baixa produção de esporos nesta época (Pitt *et al.*, 2012) se, nessa região, o período referido coincidir com uma menor humidade e precipitação. Os esporos de Botryosphaeriaceae são libertados até 2 horas após ocorrência de chuvas (Pitt *et al.*, 2012). Segundo Palmero (2007), nos 4 dias seguintes a uma chuva devem evitar-se podas. Deve-se tentar minimizar o número de feridas sendo desaconselhada poda mecânica. As zonas afetadas devem ser podadas por último (Palmero, 2007). Devem ser desinfetadas as ferramentas de poda entre cada videira com formol e lixívia a 10% durante 1-2 minutos, o que evita disseminações (Palmero, 2007).

3.2.4. Fatores condicionantes da dispersão e manifestação da doença

Fatores desfavoráveis à planta, como condições climáticas adversas ou inadequadas operações culturais, agravam os ataques dos fungos do lenho (Rego *et al.*, 2001).

Pitt *et al.* (2012) referem a sua disseminação pelo vento e salpicos da queda de chuva. As infeções dão-se quando estão reunidas condições favoráveis sendo estas longos períodos de humectação ou de elevada humidade relativa para hidratação das estruturas produtoras de esporos (que possibilitam, por vezes, infeções a 10°C) (Lehoczky, 1974; 1988) e quando os conídios entram em contacto com tecidos danificados mecanicamente (Pitt *et al.*, 2012).

Quatro estudos recentes (Amponsah *et al.*, 2009a; Kuntzmann *et al.*, 2009; Úrbez-Torres *et al.*, 2010a; van Niekerk *et al.*, 2010a), comprovaram que ocorre libertação de conídios principalmente em eventos chuvosos, salientando, os autores do último artigo, a influência da rega por aspersão na Califórnia. Nos dois primeiros estudos, Nova Zelândia e França, respetivamente, houve presença de esporos durante todo o ano, mas com maior concentração durante os meses de Verão. No de Úrbez-Torres *et al.* (2010a), na Califórnia, 60% das capturas de esporos ocorreram durante os meses de inverno, 22% no outono e primavera e apenas 3% no verão, ocorrendo semelhanças nos estudos no Sul de África para os meses de inverno (junho a setembro), sem, contudo, ter sido estudado o fenómeno para as restantes estações. É de referir que a principal época das chuvas na região da Alsácia (França), ocorre desde a primavera até ao outono, enquanto na Califórnia esta ocorre desde outubro a abril (Úrbez-Torres *et al.*, 2011) e, no caso da Nova Zelândia, as menores capturas de esporos nos meses de inverno (quando houve maior precipitação), poderão ser explicadas pela redução de inóculo verificada após a poda (Amponsah *et al.*, 2009a). van Niekerk *et al.* (2010a) e Úrbez-Torres *et al.* (2010a) mostraram que, mesmo na presença de elevada humidade relativa, a ausência de precipitação não favorecia as capturas de esporos. Segundo os mesmos autores, incrementos de temperatura até 9°C, acompanhados de chuva, resultavam em aumentos de capturas. Estes autores mostraram que a libertação de esporos pode ocorrer a temperaturas baixas entre os 3-7°C. Os efeitos de temperaturas de congelamento não foram contudo testados. Favoráveis à germinação, temos temperaturas desde 15-37°C, e ao crescimento, entre 5-37°C estando as temperaturas ótimas de infeção entre os 23-26°C (Lehoczky, 1974; 1988). Após hidratação os conídios são dispersados pelo vento e salpicos de chuva de videira para videira (Pitt *et al.*, 2012), contudo Úrbez-Torres (2011) salientou que o papel do vento na dispersão dos conídios não se encontra bem definido.

Um estudo por Úrbez-Torres e Gubler (informação não publicada, segundo Úrbez-Torres (2011)), não direcionado a *N. parvum*, salienta a importância da temperatura como fator de virulência destes fungos. Neste estudo, o comprimento da necrose na madeira causada por *L. theobromae* era quase impercetível a 10-15°C, aumentando para valores médios de 44.5mm a 20°C, 252.7mm a 35°C e 27.2mm a 40°C. Esta informação é pouca e, portanto, inconclusiva, mas pode servir como fundamento para perceber qual o principal período no qual ocorre a colonização da madeira (Úrbez-Torres, 2011). A maioria das infeções ocorre durante a época de dormência após a poda, contudo a colonização da madeira, e consequente degradação, pode ocorrer durante a época de crescimento quando as temperaturas aumentam. Em parte, a temperatura aumenta a atividade de metabolitos secundários em fungos fitopatogénicos (Wells and Boddy, 1995; Rolshausen *et al.*, 2008; Alfonzo *et al.*, 2009; Valtaud *et al.*, 2009).

3.3. Sintomatologia

As doenças associadas aos fungos Botryosphaeriaceae manifestam-se sob a forma de diferentes combinações de sintomas. A referência original aos sintomas atribuídos à primeira designação da doença, escoriose europeia, descrevia-os como lesões negras alongadas nos entrenós cedo na campanha de produção com, mais tarde, possível colapso ou “dieback”. Após colheita, as zonas negras tornavam-se brancas ou cinzento-claras, com aspeto branqueado. Observavam-se frutificações do fungo incorporadas no tecido (Ravaz e Verge, 1925; Phillips, 1998). Contudo, várias designações como “Black Dead Arm”,

“Botryosphaeria canker” ou mesmo as referidas combinações de sintomas surgiram com o aumento dos estudos na área. Destas devem ser salientadas: declínio das videiras, “dieback” do tronco e ramos, necroses no lenho, desnoca, “cane bleaching” (varas atempadas com ritidoma esbranquiçado), morte de gomos e necroses e podridão dos frutos (Kummuang *et al.*, 1996, Phillips, 2002, Úrbez-Torres *et al.* 2006a, van Niekerk *et al.*, 2006). Devido ao lento desenvolvimento das doenças causadas por estes fungos, já se verificou confusão com os causados por *Eutypa lata* (Eutipiose), *Phomopsis viticola* (escoriose americana) e pelos fungos causadores da esca (Vaz, 2008).

O declínio das videiras encontra-se mundialmente associado às espécies *F. aesculi*, *D. seriata*, *N. parvum*, *D. mutila* e *N. luteum*, em videiras com diferentes tipos de sintomas, nomeadamente cloroses foliares, morte de ramos, necroses variadas no lenho, gomos mortos, estrias negras, pontuações negras no lenho (características da doença de Petri), ritidoma esbranquiçado em varas atempadas, enxertias com falhas na junção e materiais de poda deixados na vinha (Castillo-Pando *et al.* 2001, Phillips *et al.*, 2002, van Niekerk *et al.*, 2006, Rego *et al.*, 2006). Normalmente surge em vinhas jovens, contudo pode surgir em vinhas adultas (Vaz, 2008).

Ao “Black Dead Arm” temos, como primeira espécie a ser associada, *Diplodia mutila*, em Tokai, na Hungria (Lehoczky, 1974a). Larignon & Dubos (2001) relataram a presença de *Fusicoccum aesculi* associada ao “Black Dead Arm” (BDA), contudo esta espécie veio, mais tarde, a ser identificada como afinal *N. parvum* (Laveau *et al.*, 2009) e, segundo estudos por Lecomte *et al.*, (2005) e Surico *et al.*, (2006), aceita-se comumente que estes sintomas, descritos por Larignon & Dubos, correspondem à esca e não ao BDA e caracterizam-se por uma estria castanho-clara sob o ritidoma entendendo-se desde a base do sarmento. Adicionalmente, em França, foram verificadas áreas laranja-amareladas no rebordo das estrias, diferentes da descrição original de BDA. Atualmente, também *B. dothidea* e *D. seriata* encontram associadas também associadas a outros sintomas mundialmente (Milholland, 1988; Phillips, 2002; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006a).

Na Fig. 3.2 exemplificam-se necroses no lenho em corte transversal provocadas por vários fungos da família Botryosphaeriaceae como referidas num artigo técnico sobre escoriose europeia no sítio *web* da Syngenta.



Fig. 3.2 – Necroses no lenho quando efetuado um corte transversal (Dias e Rego, 2013).

As necroses castanhas ou negras da vinha por *B. dothidea* foram primeiramente relatadas no Chile em uvas de mesa cultivar Flame Seedless (Latorre *et al.*, 1986). As necroses encontram-se distribuídas pelo tronco, cordões e sarmentos e aumentam progressivamente resultando em regiões necróticas em torno da medula (Larignon & Dubos, 2001, Larignon *et al.*, 2001, Latorre *et al.*, 1986) que quando observadas em corte transversal apresentam-se sob várias formas, de cunha, de anel (Taylor *et al.*, 2005) ou “meia-lua” (Dias e Rego, 2013), “dieback” (Castillo-Pando *et al.*, 2001, Wood & Wood, 2005, Taylor *et al.*, 2005, Úrbez *et al.*, 2011). Estas necroses em forma de cunha no tronco (Fig. 3.3 A) são por vezes difíceis de distinguir das de *Eutypa lata*. Esta doença começa a desenvolver-se primeiramente por feridas de poda, formando necroses (Fig. 3.3 B), mas também por aberturas naturais, ou lesões ocorridas na condução das vinhas.

Segundo Leavitt (1990), videiras com necroses mostraram total ausência de crescimento de lançamentos na primavera (Fig. 3.3 C e D) ou até mesmo um normal crescimento de ramos (Fig. 3.3 E). Podem ocorrer infecções na união do enxerto com formação de necroses em forma de cunha em ambos enxerto e porta-enxerto (Fig. 3.3 F). Inclusive, no mesmo cordão deu-se o crescimento saudável de lançamentos e ausência de crescimento de outros. Nestes casos, foi *L. theobromae* referida como a mais prevalente ou mesmo a única isolada. Embora comum em videiras mais velhas, esta espécie, bem como o crescimento retardado de lançamentos, já foi registado em videiras com menos de 5 anos (Leavitt 1990; Úrbez-Torres *et al.*, 2008). *L. theobromae* foi reconhecida como uma das mais prevalentes doenças na Califórnia, limitando produção e longevidade (Úrbez-Torres *et al.*, 2006a; Úrbez-Torres e Gubler, 2009), mas *N. parvum* também já se encontrou associada a “Botryosphaeria canker” na Turquia (Akgul *et al.*, 2014).

Vários sintomas associados a “Bot canker” como necroses em forma de cunha, estriamento negro e/ou necrose de gomos coincidem com os já utilizados para descrever o BDA, concluindo-se que, por vezes, estas duas designações têm sido utilizadas para se referir aos mesmo sintomas (Úrbez-Torres *et al.*, 2011).

Muitas vezes isolam-se diferentes espécies de Botryosphaeriaceae e outros fungos do lenho numa mesma zona sintomática da planta, surgindo confusão sobre o tipo de doença e o agente causal associados (Úrbez-Torres *et al.* 2006a; Luque *et al.*, 2009; Úrbez-Torres *et al.*, 2011), nomeadamente *E. lata*. Aliado a este facto, as mais de 20 espécies de *Botryosphaeria* conhecidas até à data capazes de infetar videiras, reforçam a ideia de que uma designação única para definir uma doença particular parecem desapropriadas (Úrbez-Torres *et al.*, 2011). Em termos gerais, parece mais apropriada a utilização do termo “*Botryosphaeria* dieback” para referir a generalidade de sintomas causados por Botryosphaeriaceae, do que “Black Dead Arm” ou “Bot canker” (Úrbez-Torres *et al.*, 2011).

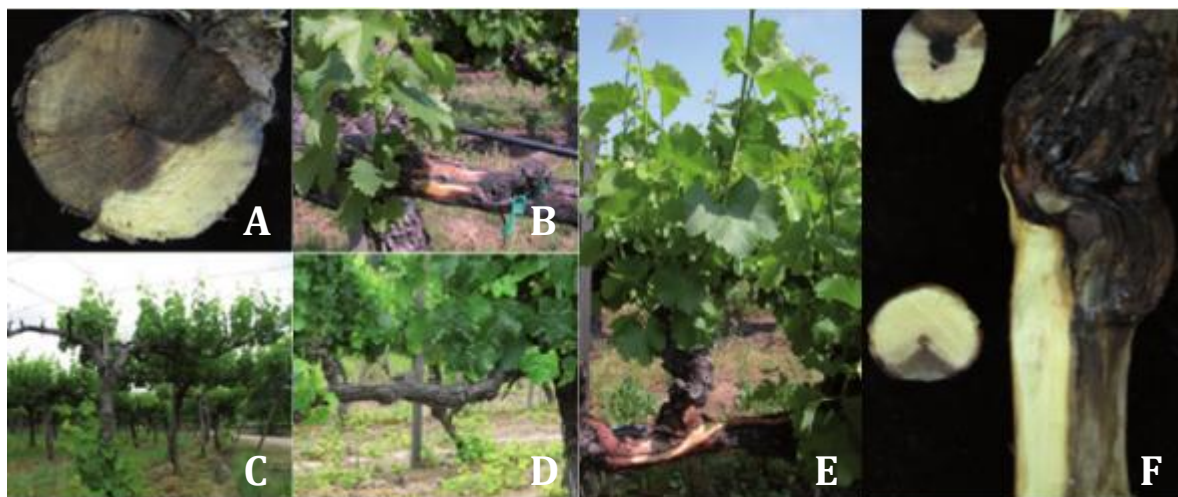


Fig. 3.3 - Sintomas descritos como “Botryosphaeria canker” (Úrbez-Torres, 2011).

3.4. Patogénese

Das várias respostas por parte da planta anteriormente mencionadas como a acumulação de tiloses e gomoses, taninos nos vacúolos ou fitoalexinas como o resveratrol também se observaram em videiras afetadas por *Botryosphaeria* “dieback” (Bertsch et al., 2013).

Contudo, o processo pelo qual fungos *Botryosphaeriaceae* causam a doença ainda não se encontra bem definido (Úrbez-Torres *et al.*, 2011). Foi feita uma pesquisa intensa por parte de certos autores (Venkatasubbaiah e Chilton, 1990; Venkatasubbaiah *et al.*, 1991; Barbosa *et al.*, 2003; Crognale *et al.*, 2003; Selbmann *et al.*, 2003; Corradi da Silva *et al.*, 2005), em hospedeiros não vitícolas, no sentido de identificar certos exopolisacarídeos (EPS) segregados por *L. theobromae* e *D. seriata*, sem, contudo, saber se estas produziam estes compostos. Martos *et al.* (2008) mostraram pela primeira vez que cinco espécies de *Botryosphaeriaceae* (*B. dothidea*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. parvum* e *S. viticola*) eram capazes de produzir compostos hidrofílicos de elevado peso molecular com propriedades fitotóxicas, que se pensavam ser EPS. No mesmo estudo, uma análise mais profunda de EPS produzidos por *N. parvum* revelou serem substâncias compostas principalmente por glucose, manose e galactose e foi também demonstrado que, enquanto *N. luteum* e *N. parvum* possuíam a maior atividade fitotóxica, *B. dothidia*, *D. seriata* e *S. viticola* caracterizavam-se por menores índices de fitotoxicidade. Estes resultados são concordantes com prévios ensaios de patogenicidade (Úrbez-Torres, 2011). Também se revelou que *N. luteum* e *N. parvum* produziam fitotoxinas ácidas, lipofílicas e de baixo peso molecular (Martos *et al.*, 2008). A própria imersão das folhas em filtrado de cultura de *N. parvum* provocou murchidão destas e o aparecimento de manchas descoloradas. Contudo, mais recentemente, estes compostos de baixo peso molecular apenas foram identificados estruturalmente, sendo da forma (3R, 4R)-(-)-4-hidroximeleina, (3R,4S)-(-)-4-hidroximeleina, isosclerona e tirosol, por Evidente *et al.*, (2010). Todos os quatro metabolitos provocaram murchidão de folhas de tomate com especial referência a (3R,4S) - (-) -4-hidroximeleina e isosclerona. Mais 4 compostos foram identificados noutro estudo, incluindo meleina, 4-hidroximeleina, 7-hidroximeleina, e 4,7-dihidroximeleina (Djoukeng *et al.*, 2009). 4,7-dihidroximeleina causou total necrose

de folhas em videira, apesar de todos os compostos possuírem semelhante nível de toxicidade. Estes resultados são sugestivos, contudo carecem de comprovação com ensaios *in vivo*, bem como da identificação destes compostos em vinhas previamente infetadas por fungos Botryosphaeriaceae.

3.5. Meios de luta

O controlo da generalidade das doenças do lenho deve ter sempre por base uma eficiente prevenção (Dubos, 1999; Larignon, 1999). Isto deve-se ao facto de, por falta de fungicidas homologados (Vaz, 2008) ou especificamente direcionados ao controle (Pitt *et al.*, 2012), pela abundância de espécies e pela disseminação e plantação de material já infetado, o controlo destas ser difícil (Vaz, 2008). A vasta distribuição geográfica também implica que medidas eficientes numa região possam não ser eficientes noutra. Duas estratégias propostas por Pitt *et al.* (2012), baseiam-se na quebra do ciclo da doença e na recuperação de vinhas afetadas ao seu estado de plena produção.

A quebra da doença pode ser efetuado por aplicação de agentes de controlo para impedir novas infeções derivadas da libertação de conídios ou ascósporos ou removendo a fonte de inóculo nomeadamente videiras ou restos poda de infetados (Pitt *et al.*, 2012).

Segundo Úrbez-Torres (2011) o controlo de fungos da família Botryosphaeriaceae combina o uso de luta química, biológica e práticas culturais.

Tradicionalmente usa-se “cirurgia corretiva”, um método de prolongamento da vida de vinhas infetadas por *E. lata* (Carter, 1991; Sosnowski *et al.*, 2008; Sosnowski *et al.*, 2010b). Este método inclui poda de toda a madeira infetada pelo menos 10 cm abaixo dos sintomas vasculares visíveis (necrose ou faixas negras) (Úrbez-Torres, 2011). É necessário então que a vinha seja depois reconduzida a partir de lançamentos saudáveis provenientes de gomos localizados em esporoes ou mesmo no tronco para substituir as secções da vinha destruídas pela doença (Úrbez-Torres, 2011). No caso de vinhas sem enxertia, os ladroes que brotam perto do solo parecem ser os mais indicados para este processo (Leavitt, 1990). Devem ser aplicados agentes protetores nas feridas deixadas após a poda, principalmente se a inoculação for feita quando o período de maior concentração de inóculo ocorrer (época de dormência na Califórnia). Assim, o período mais aconselhável para fazer a operação é durante os meses secos do verão (Úrbez-Torres, 2011). Se a “cirurgia corretiva” não for possível executar devem remover-se as vinhas infetadas para evitar a acumulação de inóculo (Úrbez-Torres, 2011).

Como vantagens desta técnica, comparativamente à replantação, temos a preservação dos clones originais, qualidade dos frutos, mais rápido retorno à produção, e robustez devido a sistemas radiculares bem desenvolvidos (Creaser & Wicks, 2004). As mais diretas desvantagens são o trabalho exigido na sua execução, a habilidade exigida por parte dos trabalhadores, sendo que, atualmente, não é viável em muitas regiões do mundo (Úrbez-Torres, 2011) com custos de 4.2 dólares por vinha ou 5300 dólares/ha na Califórnia (Epstein *et al.*, 2008). A poda dupla, também utilizada no controle de *E. lata* (Weber *et al.*, 2007), provou ser bastante eficiente na redução de infeções causadas por *L. theobromae* e *N. parvum* (Úrbez-Torres e Gubler, 2009b). Contudo, é apenas economicamente viável em vinhas cuja primeira poda seja

feita mecanicamente estando limitada a sistemas de condução vertical dos sarmentos e o segundo corte deve ser feito no verão, quando a susceptibilidade das feridas é menor (Úrbez-Torres, 2011).

3.5.1. Luta cultural

A prevenção começa com a implementação de medidas de controlo logo nos viveiros produtores de material de propagação (Oliveira *et al.*, 2004). É possível, antes da enxertia, encontrar picnídios em zonas das estacas onde ocorreu “cane bleaching”, sendo maior a sua evidência em garfos de *Vitis vinifera* do que em porta-enxertos por ser possível, estes últimos, não revelarem sintomas (Fourie & Halleen, 2002). No caso de enxertos-prontos e bacelos, há que atender à existência de necroses do lenho para determinar a presença do inóculo (Vaz, 2008).

Deve ser favorecida a formação duma estrutura de solo que permita arejamento e drenagem deste de forma a evitar condições de stresse para a planta (Dubos, 1999, Larignon, 1999).

Antes da vindima, deve ser efectuado o arranque de plantas doentes e mortas devendo marcar previamente as plantas (Palmero, 2007) e, segundo Lecomte *et al.* (2006), no inverno, devem ser compostados quaisquer materiais de poda caso se queira reintroduzir esse material no ciclo da cultura com a maioria dos patógenos do lenho já destruídos pelas altas temperaturas. Caso contrário, o material deve de ser removido rapidamente da parcela e queimado (van Niekerk *et al.*, 2004). Na eventualidade de que seja necessário um processo de armazenamento, este deve ser feito de forma a impedir condições de humectação ou humidade relativa elevadas e assim a libertação de esporos (Rego *et al.*, 2001). No caso de cepas ainda viáveis, é possível a apenas remoção da madeira infectada, tal como para a eutipiose (Savocchia *et al.*, 2005).

Produtos que estimulam os mecanismos de defesa da planta como o ácido 2 – hidroxibenzóico ou ácido salicílico parecem ter um efeito promisor em BDA e Esca, com outros produtos resultando numa redução de 30% em plantas mortas (Sentenac *et al.*, 2004). Estes produtos fitofortalecedores podem ser administrados por pulverização foliar ou injeção (Fuente *et al.*, 2016).

3.5.2. Luta Física

Tratamentos com água quente a 51-53°C controlaram 8 espécies de Botryosphaeriaceae patogénicas da vinha (Elena *et al.*, 2015). Sendo que Vignes *et al.* (2009) concluíram que tratamentos com água quente constituem o único método, de entre vários métodos testados, promissores reduzindo contaminações de *B. dothidea*, *D. seriata* e *Pa. chlamydospora* durante vários anos em viveiros em França.

3.5.3. Luta química

Uma das estratégias de controlo é a da aplicação de substâncias químicas a feridas de poda, que podem estar suscetíveis até 4 meses (Pitt *et al.*, 2012). A principal desvantagem deste método é o da redução da sua eficácia após lavagem com águas da chuva, a segunda desvantagem reside no facto de que adiar a poda até ao início da primavera, como mencionado previamente como estratégia sugerida por autores como

Larignon *et al.* (2000) e Pitt *et al.* (2012), não é viável em climas com frequentes chuvas na primavera, para além do facto de que esta prática atrasa a quebra da dormência e consequentemente a entrada em produção (Travadon *et al.*, 2013).

Num estudo feito por Pitt *et al.* (2012), avaliou-se a eficácia de 20 fungicidas na inibição de 50% do crescimento micelial (valores de EC₅₀) de 4 espécies da família Botryosphaeriaceae. Estes valores tendem a variar consoante o fungicida e o isolado. Nos ensaios *in vitro*, as substâncias ativas com os valores de EC₅₀ mais baixos (inferiores a 1mg/L) foram o fludioxonil, o carbendazime, o fluaziname, o tebuconazol, o flusilazol, o penconazol, a procimidona, a iprodiona, o miclobutanil, e a piraclostrobina. Também foram testadas substâncias como o “A.T.C.S. tree wound dressing” (revestimento para feridas de árvores), o Garrison e o agente de controlo biológico Vinevax (contendo *Trichoderma harzianum* Rifai). Nos ensaios de campo, o carbendazime, o fluaziname, o tebuconazol, o Garrison (ciproconazol e o iodocarbe) e o “A.T.C.S. tree wound dressing”, aplicados em feridas de poda frescas, foram os mais eficazes reduzindo a infeção por *Diplodia seriata* e *Diplodia mutila* entre 41 e 65%, contudo, referem os autores, revestimentos como o A.T.C.S. não possuem efeito curativo contra esporos já presentes na superfície antes da aplicação. O Vinevax, mesmo quando formulado como uma pasta, apresentou um controlo limitado da doença.

Também Amponsah *et al.* (2012) conseguiram resultados com procimidona, tiofanato de metilo, fenarimol e mancozebe *in vitro*.

Assim, estudos por Pitt *et al.* (2012), entre outros investigadores, sugerem que produtos contendo os fungicidas inibidores da desmetilação (DMI - Demethylation Inhibitors) tebuconazol, flusilazol, e ciproconazol, bem como o fluaziname e o fludioxonil representam, atualmente, os fungicidas mais promissores no controlo simultâneo de *E. lata* e *Botryosphaeria*.

Rolshausen *et al.* (2010) foram os primeiros a avaliar a eficácia de diferentes fungicidas como protetores de feridas de poda contra Botryosphaeriaceae em experiências de longo prazo. Estes autores descobriram a eficiência do tiofanato-metilo (família ou MOA dos Benzimidazóis) com valores inibição de crescimento micelial de 77-82% para 4 espécies de Botryosphaeriaceae e 100% para *E. lata*, sendo até eficaz contra *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum*, *Pm. parasiticum* e *Pleurostomophora richardsiae*. Piraclostrobina e ciproconazol mais iodocarbe, bem como uma pasta baseada em boro, conhecida por reduzir com sucesso infeções causadas por *E. lata* (Rolshausen e Gubler, 2005) oferecem também alguma proteção contra as espécies de Botryosphaeriaceae testadas, contudo, quando aplicado como ácido bórico misturado em água, esta acumulava-se em ramos e folhas e dava-se a falência do gomo no primeiro nó abaixo da ferida tratada.

Rolshausen *et al.* (2010), e subsequentemente, Sosnowski *et al.* (2010) utilizando Biopaste, uma mistura a 5% (peso/volume) de ácido bórico e tinta de latex, e Gelseal, contendo tebuconazol e ácido bórico, forneceram 48-79% de controlo contra Botryosphaeriaceae e 99-100% para *E. lata*.

Testes *in vitro* com “*B.* obtusa”, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum* e *Lasiodiplodia theobromae*, realizados por Bester *et al.* (2007), comprovaram a eficiência, para além de alguns fungicidas já mencionados, do

benomil, cloreto de procloraz-manganésio na inibição do crescimento micelial, com EC_{50} variando entre 0,36 – 0,55, 0,07 – 0,17, 0,07 – 1,15 e 0,04 – 0,36 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. Ainda neste estudo deve ser referida eficiência no controle de *Pa. chlamydospora*, *P. viticola* e *E. lata*.

Na Austrália, Savocchia *et al.* (2005) demonstraram a eficácia *in vitro* de tebuconazol, flusilazol espiroxamina e fluaziname contra crescimento micelial de *D. seriata* e *N. luteum*, não tendo sido testado o efeito contra *N. australe*, *N. parvum* e *L. theobromae*.

Em Portugal encontra-se pelo menos um produto homologado para controlo da escoriose europeia, o SCORE, à base de difenoconazol (António Dias, retirado do sítio online Syngenta).

Rego *et al.* (2014) descobriram que a aplicação de Bion (benzotiadiazol)+ Cuprocol (oxicloreto de cobre) após a poda seguida de uma aplicação de Bion + Score (difenoconazole) nos estados fenológicos C/D foi o tratamento mais eficiente no sentido de consistentemente reduzir a incidência de e severidade de fungos *Botryosphaeria* e *Phomopsis*.

Leavitt (1990) foi o primeiro a conseguir reduzir infeções por *L. theobromae* aplicando benomil, captana, iprodiona e penconazol em feridas de poda. Ainda neste estudo, descobriu-se que tinta de látex não constituía um método aceitável de controlo como até então se pensava. Contudo, Epstein *et al.* (2008) mostraram ser eficaz no controle de *D. seriata* quando aplicada em feridas após poda ou “cirurgia”. Diferenças estas explicadas provavelmente por diferenças em virulência entre *L. theobromae* e *D. seriata* (Úrbez-Torres, 2011). Num estudo por Bester *et al.* (2007), foi testada a eficácia de 10 fungicidas diferentes como potenciais agentes protetores de feridas de poda contra *L. theobromae*, *D. seriata*, *N. australe*, e *N. parvum* no Sul de África. Contudo, os resultados foram considerados inconclusivos devido à baixa/variável incidência de reisolamento, apesar de os ensaios *in vitro* mostrarem a elevada eficácia do benomil, tebuconazol, procloraz (cloreto de manganésio), e flusilazol na inibição de crescimento micelial e de ensaios em estufa apontarem para o benomil, tebuconazol e procloraz como potenciais protetores de feridas de poda.

Latorre *et al.* (2013) comprovaram a sensibilidade *in vitro* de *N. parvum* a pastas de benomil, tebuconazol e iprodiona.

Atualmente, o controlo total de doenças do lenho em geral é praticamente impossível devido à improbabilidade de que um único produto aplicado possa controlar o vasto espectro de doenças (Úrbez-Torres, 2011), e devido ao elevado número de feridas provocadas nas plantas a cada ano e o prolongado tempo de susceptibilidade destas (Rolshausen *et al.*, 2010). Além disso, é desconhecido o tempo que as feridas de poda podem ser protegidas por estes tratamentos, o custo de aplicação manual é elevado e existe a possibilidade de que mais que uma aplicação seja necessária, tornando estes tratamentos economicamente inviáveis (Úrbez-Torres, 2011). Segundo Úrbez-Torres e Gubler (2011), não é viável reduzir o número de aplicações a ramos mais velhos, porque ambos, com um e dois anos de crescimento, são susceptíveis à infeção.

Segundo a base de dados da Comissão Europeia, fungicidas como o flusilazol, o benomil e a procimidona encontram-se proibidos para uso na maioria senão em todos os países da União Europeia. O carbendazime encontra-se aprovado apenas para Portugal, Espanha, Polónia e Reino Unido. O ciproconazol, apesar de permitido noutros países, não parece estar autorizado em Portugal para uso em vinha como fungicida. Assim, dos 5 fungicidas inibidores da desmetilação mencionados neste trabalho (tebuconazol, flusilazol, ciproconazol, fluaziname e o fludioxonil) apenas o tebuconazol, fludioxonil e o fluaziname constituem as opções mais viáveis, até porque parecem controlar também *E. lata*. Quanto ao iodocarbe, tiofanato-metilo e cloreto de procloraz-manganésio não se consegue concluir sobre o seu estado, já que não foram encontrados na base de dados da Comissão Europeia.

Algum desapontamento surge também aquando dos estudos com Biopaste e Gelseal, que, apesar de mostrarem resultados aceitáveis no controlo de alguns fungos Botryosphaeriaceae e *E. lata*, não constituem produtos viáveis para uso na União Europeia por conterem ácido bórico.

O mancozebe, o ciprodinil e o oxicleto de cobre possuem autorização para uso em vinha na maioria dos países da União Europeia.

3.5.4. Luta biológica

Como agentes redutores do crescimento micelial de *Botryosphaeria*, em testes in vitro descobriu-se o efeito de vários micoparasitas *Trichoderma* spp. (KeXiang *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003). Segundo os mesmos autores, como antagonista de *Botryosphaeria dothidea*, em pistacho, existe *Paenibacillus lentimorbus*, tendo reduzido bastante a infeção em feridas de poda, se inoculado previamente ao mesmo (KeXiang *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003).

Indutores de mecanismos de defesa

A quitosana, um polímero biológico que se obtém por desacetilação da quitina, não é tóxico, é biodegradável e funciona como eliciador ou ativador de mecanismos de defesa das plantas. Neste sentido, inibe a ação de poligalacturonases produzidas pelos fungos, estimula a planta a produzir fitalexinas e a sintetizar enzimas, inibidoras do crescimento de um elevado número de fungos, como a quitinase, quitosanase e peroxidase. Em Portugal, ensaiaram-se e comprovaram-se os efeitos da quitosana contra os principais fungos do lenho da videira, inclusive Botryosphaeriaceae (Nascimento *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2008).

4. Material e métodos

4.1. Localização dos ensaios

Realizaram-se dois ensaios de eficácia de produtos comerciais no controlo de *Pa. chlamydospora* e *Neofusicoccum parvum* em feridas de poda de videira. O Ensaio 1 localizou-se em Alenquer (Fig. 4.1), no dia 5 de Fevereiro de 2013, na Quinta D. Carlos, estrada de Santana da Carnota, num terreno declivoso exposto a sul e representativo da generalidade de condições de solo da região, e o Ensaio 2 em Arruda dos Vinhos, terreno plano, no dia 7 de Fevereiro de 2013, tendo a recolha dos dados sido feita ao longo do período compreendido entre meados de setembro e outubro.

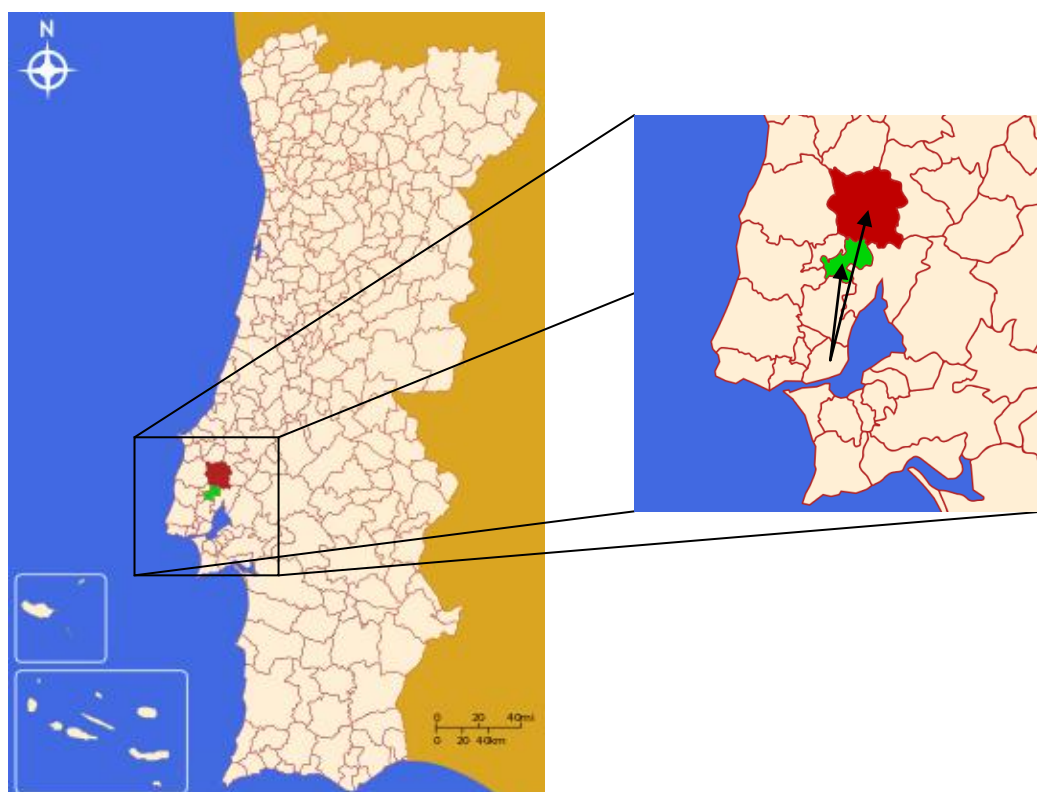


Fig. 4.1 – Localização dos ensaios. Concelho de Alenquer (vermelho) e Concelho de Arruda dos Vinhos (verde).

4.2. As vinhas

A vinha de Alenquer era da casta tinta Aragonez. Em Espanha é conhecida como Tempranillo e, no Norte de Portugal, Tinta Roriz. Tinha uma idade de 12 anos e sem evidência de quaisquer sintomas de doenças. O sistema de condução era o Guyot Duplo. A distância entre videiras era de 0,90 x 2,40 m. A vinha do Ensaio 2 era da casta Pinot Noir com 20 anos de idade e sem evidência de quaisquer sintomas de doenças. O ideal para estudos de eficácia de fungicidas no controlo de doenças do lenho seriam vinhas com menos de 10 anos, ou seja, vinhas jovens e, consequentemente, mais suscetíveis, pois resultados obtidos com

fungicidas em vinhas mais velhas podem não ser generalizáveis às mais suscetíveis. O sistema de condução era cordão bilateral e a distância entre videiras era de 1,00 x 2,40 m.

As videiras em ensaio foram ainda alvo de poda em verde (desponta, monda de sarmentos, desladroamento e desfolha) não se tendo procedido à monda de cachos. É ainda de referir que os tratamentos contra as principais doenças, pragas e infestantes foram realizados de acordo com o procedimento habitual da quinta onde foi instalado o ensaio. Foi feita uma poda longa (Fig. 4.2) de forma a não permitir a colonização do braço da videira durante o período de 7 meses de crescimento dos fungos dentro do lenho. O corte deve ser feito o mais horizontal possível para impedir escorrimento dos produtos.

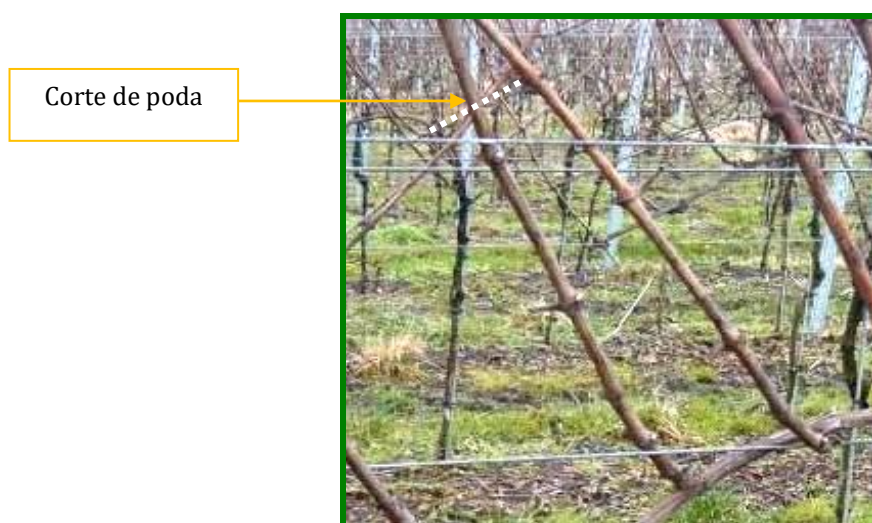


Fig. 4.2 - Nível de poda das videiras.

4.3. Unidade experimental

As varas destinadas à inoculação pertenciam ao crescimento do ano, possuíam aparência semelhante (entrenós, comprimento e gomos) e tinham sido podadas um a dois centímetros acima do terceiro nó com o corte o mais horizontal possível. Foram efetuadas 30 repetições por cada tratamento. Cada vara representava uma unidade experimental.

4.4. Isolados

No Quadro 4.1 encontram-se descritas informações relativas à origem dos fungos utilizados para os ensaios de campo.

Quadro 4.1 – Isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Neofusicoccum parvum* usados nos ensaios.

Espécie	Código do isolado	Origem geográfica	Data da obtenção	Castas/Porta-enxerto
<i>Pa. chlamydospora</i>	Ph19	Vidigueira, Alentejo	2008	Petit Verdot/400VO
<i>N. parvum</i>	Np 67	Estremadura	2006	Fernão Pires/-

Na Fig. 4.3, tal como em Amponsah *et al.* (2011), a colónia de *N. parvum* apresenta micélio com aspeto cotonoso e esbranquiçado nas margens, tons acastanhados na face inferior, e, no centro, com cor cinzenta. A colónia de *Pa. chlamydospora* apresentava-se cinzenta-olivácea com uma frente de crescimento esbranquiçada tal como descrito por Pinto (2010).

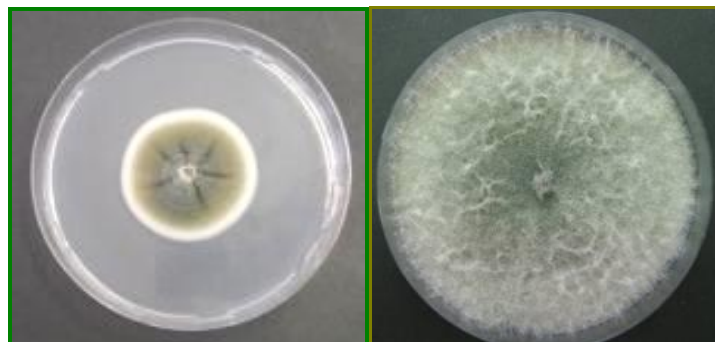


Fig. 4.3 – Colónia do isolado Ph 19 de *Phaeomoniella chlamydospora* (esquerda) e do isolado Np 67 de *Neofusicoccum parvum* (direita) em PDA.

Para a obtenção da suspensão de esporos de *Pa. chlamydospora*, retiraram-se da extremidade das colónias do isolado Ph 19, em PDA, com 14 dias de crescimento a 20°C, discos miceliais de 3 mm que foram transferidos para balões Erlenmeyer contendo 250ml de PDB (Potato Dextrose Broth). Após 14 dias, a 20°C na obscuridade e sob agitação contínua (90 batidas/minuto) num agitador Edmund Bühler VKS-75, as culturas líquidas foram filtradas, no sentido de remover os fragmentos de micélio, e a concentração de esporos ajustada, com o auxílio de um hemocitómetro, de forma a dosear cerca de 5×10^4 esporos/mL.

Para a obtenção da suspensão aquosa de conídios de *N. parvum* inocularam-se placas de Petri contendo 15mL de água de agar a 2% e agulhas de pinheiro, com discos miceliais de 3mm, e que foram incubadas sob a ação de radiação emitida por lâmpadas tubulares Ultra-Violeta Próximo (NUV) “Philips TL 8W/05” (Phillips, 2002, Crous *et al.*, 2006, Úrbez-Torres *et al.*, 2006a), a 25°C. Após 10-20 dias de incubação, as culturas foram observadas com o auxílio de uma lupa binocular (Leica MZ 125, ampliação x10), para deteção de picnídios maduros. Com o auxílio de uma agulha esterilizada, os picnídios foram retirados das placas e transferidos para um “Eppendorf” de 1,5mL contendo água destilada esterilizada. A suspensão obtida foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado, agitada em “Vortex”, para efectivar a libertação dos conídios e filtrada (filtro para esporos de malha nº1) para eliminar o micélio existente. Fez-se a transferência para um balão Erlenmeyer e ajustou-se a concentração de esporos, com o auxílio de um hemacitómetro, de forma a obter-se uma concentração final de, aproximadamente, 5×10^4 esporos/mL.

4.5. Os tratamentos

No Ensaio 1, utilizaram-se duas diferentes formulações de *Trichoderma atroviride* da estirpe I-1237, contidos nos produtos Esquive e Tri-Wall, fornecidos para estudo pela empresa Agrauxine. O Esquive constituía uma formulação de pó molhável com 10^{12} esporos/Kg, o Tri-Wall também era um pó molhável mas com o dobro da concentração de esporos e ambas com alto potencial para germinação. No Ensaio 2 foram utilizados produtos da empresa BASF, cuja designação (BAS 516) se encontrava ao abrigo de um acordo de confidencialidade. Os tratamentos, listados no Quadro 4.2 e Quadro 4.3, foram distribuídos pelas videiras aleatoriamente.

Quadro 4.2 - Tratamentos efetuados nas videiras do Ensaio 1 em Alenquer.

Nº do tratamento	Produto	Inóculo	Repetições
1	Não tratado	-	30
2	Não Tratado	<i>N. parvum</i>	
3	Não Tratado	<i>Pa. chlamydospora</i>	
4	Esquive	<i>N. parvum</i>	
5	Esquive	<i>Pa. chlamydospora</i>	
6	Tri-Wall	<i>N. parvum</i>	
7	Tri-Wall	<i>Pa. chlamydospora</i>	
Total			210

Quadro 4.3 - Tratamentos efetuados nas videiras do Ensaio 2 em Arruda dos Vinhos.

Nº do tratamento	Produto	Inóculo	Repetições
1	Não tratado	-	30
2	Não tratado	<i>N. parvum</i>	
3	Não tratado	<i>Pa. chlamydospora</i>	
4	BAS 516 BX F	<i>N. parvum</i>	
5	BAS 516 BX F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
6	BAS 516 BZ F	<i>N. parvum</i>	
7	BAS 516 BZ F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
8	BAS 516 BY F	<i>N. parvum</i>	
9	BAS 516 BY F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
10	BAS 516 CA F	<i>N. parvum</i>	
11	BAS 516 CA F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
12	BAS 516 AJ F	<i>N. parvum</i>	
13	BAS 516 AJ F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
14	BAS 516 CF F	<i>N. parvum</i>	
15	BAS 516 CF F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
16	BAS 516 CG F	<i>N. parvum</i>	
17	BAS 516 CG F	<i>Pa. chlamydospora</i>	
18	Difenoconazol (Score®)	<i>N. parvum</i>	
19	Difenoconazol (Score®)	<i>Pa. chlamydospora</i>	
Total			570

A preparação dos produtos foi feita segundo protocolo (26 g/L) e a aplicação imediatamente após a poda, efetuando uma única pulverização do produto na ferida, sob condições o mais favoráveis possível, nomeadamente, tempo nublado, húmido e com temperaturas de aproximadamente 15°C.

Após a aplicação do produto à ferida, foram aplicados a cada ferida de poda, com recurso a uma micropipeta, 40µl de suspensão aquosa conidial de forma a inocular aproximadamente 2000 esporos por ferida.

Em seguida, as feridas foram protegidas com “parafilm” para prolongar a humidade em torno da ferida durante 2-3 semanas.

Nas testemunhas efetuou-se o mesmo processo, mas substituiu-se a inoculação do fungo por água destilada e esterilizada no mesmo volume.

4.6. Parâmetros a avaliar e método de recolha de dados

4.6.1. Material proveniente do Ensaio 1 (Alenquer)

Após 7 meses de crescimento dos fungos em condições de campo, no dia 2 de setembro de 2013, trouxeram-se as varas para avaliação de parâmetros em laboratório. Estas foram colocadas em sacos devidamente identificados e armazenadas em laboratório.

No Ensaio 1, os vários parâmetros que se avaliaram, por tratamento, foram: o comprimento da necrose, a incidência (% de varas infetadas) e a severidade (% de infeção em varas infetadas) e o reisolamento por nível do talão (% de infeção por nível nas varas infetadas).

No Ensaio 2, apenas o comprimento das necroses nas varas não foi avaliado, adicionalmente, foram registados o perímetro e comprimento das varas (que não se consideraram relevantes para análise estatística dada a natureza do estudo).

A medição do perímetro das varas foi efetuada logo que possível para não comprometer o valor real destas devido à perda de água. Ao mesmo tempo registou-se o comprimento das necroses. Para a medição do comprimento das necroses nos tecidos internos começou-se por fazer um corte longitudinal nas varas provenientes de Alenquer, com recurso a uma tesoura de poda.

Seguiu-se a fase de reisolamento de *N. parvum* e *Pa. chlamydospora* a partir de três diferentes níveis da vara. Esta fase foi iniciada o mais cedo possível após o registo do comprimento das necroses. O Nível 1 localizava-se na região um centímetro abaixo do segundo gomo, o Nível 2, um centímetro abaixo do terceiro gomo, e o Nível 3, logo abaixo da zona de poda ou de inoculação do fungo. Retirou-se de cada nível uma secção com 5 milímetros de espessura, removendo previamente o ritidoma, com o objetivo de reduzir o aparecimento de fungos saprófitas. Cortou-se cada uma em 4 fragmentos iguais os quais foram colocados em vidros de relógio distintos e devidamente identificados.

Os fragmentos inoculados com *N. parvum* foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 7% durante aproximadamente 30 segundos, lavados em água destilada esterilizada, também durante aproximadamente 30 segundos, secos em papel de filtro e colocados em placas de Petri contendo 15ml de gelose de batata dextrosada (PDA, Potato Dextrose Agar, Difco Laboratories. Detroit, MI, USA) e 250mg/L de cloranfenicol. Os fragmentos inoculados com *Pa. chlamydospora* sofreram o mesmo procedimento com a adição de uma desinfecção superficial, antes da desinfecção com hipoclorito, por imersão em etanol a 70%, evaporado à chama (Adalat *et al.*, 2000). O meio de cultura em que foram colocados era composto por extracto de malte a 2% (ME, Malt Extrat, Difco Laboratories . Detroit, MI, USA) por 15g de gelose (BA, Difco Laboratories . Detroit, MI, USA) e 250 mg/L de cloranfenicol. As placas foram colocadas em estufa de incubação a 22 °C, na obscuridade. O total de fragmentos a analisar foram 210 varas x 3 níveis x 4 fragmentos = 2520 fragmentos.

Após obtenção de crescimento micelial com aproximadamente 10 dias, registou-se o número de fragmentos que se encontravam contaminados em cada um dos 3 níveis de cada repetição. As identificações dos fungos tiveram início no dia 12 de setembro e terminaram no dia 2 de outubro de 2013, e foram feitas com base nas suas características culturais. Calcularam-se os valores médios de incidência por tratamento (% de varas infetadas por tratamento). Em seguida, calculou-se a severidade associada a cada nível de cada repetição, a severidade associada a cada repetição e a severidade média associada a cada tratamento. O total de fragmentos a analisar foram 570 varas x 3 níveis x 4 fragmentos = 6840 fragmentos.

Fez-se uma transformação angular dos dados em percentagens ($\arcsen\sqrt{x}$). Finalmente, procedeu-se a uma análise estatística dos dados através de uma ANOVA a um fator, com efeitos fixos e distribuição normal e a um Teste de Tukey de comparação de médias com um nível de significância de 5% com recurso ao *software* R. Para verificar se o pressuposto de igualdade de variâncias foi cumprido e, consequentemente, realizar-se o teste ANOVA, efetuou-se um teste de Levene por ser robusto à violação do pressuposto de normalidade (Devore e Berk, 2011). O comando para o teste de Levene pôde ser obtido pelo pacote *lawstat* disponível para o software R. Nos casos em que o princípio foi violado, recorreu-se a um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, recorrendo-se a um método de comparações múltiplas através do comando *pairw.kw*, fornecido pelo pacote *asbio*, disponível para o software R, que se baseia no procedimento corretivo conservativo de Bonferroni aplicável a testes com elevado número de comparações. Relativamente aos tratamentos na região de Alenquer, o método de comparações múltiplas utilizado, após o teste de Kruskal-Wallis, baseou-se no comando *kruskalmc*, contido no pacote *pgirmess* dado que o número de comparações foi reduzido.

Também se fez uma análise da dispersão dos dados e concluiu-se existirem várias “observações atípicas” ou “*outliers*”, ou seja, observações com valor particularmente distante dos restantes que podem ser devidos a erros de procedimento na experiência ou simplesmente por variabilidade que ocorre normalmente. Nalguns casos, considerou-se que estas “observações atípicas” ocorreram devido a erros de procedimento durante a experiência (excesso/defeito na aplicação de pesticida, tesoura de poda contaminada, ferida da poda não horizontal, videira particularmente mais resistente/suscetível ao fungo,

etc). No primeiro caso estas observações devem ser removidas da análise estatística, enquanto no segundo devem ser mantidas e apenas demonstram que o pressuposto inicialmente assumido de distribuição de probabilidade para cada tratamento tem falhas e que estas não pertencem ao mesmo grupo.

4.6.2. Material proveniente do Ensaio 2 (Arruda dos Vinhos)

Antes da realização do reisolamento a partir dos níveis das varas mediu-se o perímetro das varas e comprimento dos entrenós incluindo o comprimento desde o primeiro gomo até ao corte de poda. Este processo foi feito o mais cedo possível antes do dessecamento das varas e consequente diminuição do perímetro real destas.

Para ambos os tipos de fragmentos (inoculados com *Pa. chlamydospora* ou *Neofusicoccum parvum*) seguiram-se os procedimentos respetivos, já descritos previamente, com a diferença de não ter sido feita distinção entre meios de cultura utilizados, ou seja, a composição destes foi a de 15g de Agar + 20g de Extrato de Malte + 250 mg/L de cloranfenicol.

Na recolha dos resultados, devem evitar-se zonas muito necróticas resultantes do natural dessacamento da madeira pois, devido ao lento crescimento destes, existe pouca probabilidade de se extrair os fungos. Deve-se, assim, optar por madeira com aparência menos necrótica.

5. Resultados e Discussão

Não foi possível a comparação dos resultados com estudos prévios por não terem encontrado estudos com os mesmos fungicidas e nos mesmos fungos.

Os dados recolhidos foram submetidos a uma análise de variâncias no sentido de testar a hipótese nula de não existirem diferenças entre os vários tratamentos no que diz respeito aos parâmetros referidos, ou seja, a hipótese de não existirem tratamentos mais eficazes do que outros no controlo dos dois fungos inoculados. Não se incluíram quadros a discriminar os dados recolhidos do campo utilizados para calcular os parâmetros do ensaios por serem muito extensos, o que acarretaria na criação de um quadro com, pelo menos, 2340 linhas (780 repetições x 3 níveis), e por apenas os valores médios serem relevantes.

O número de tratamentos efetuados no Ensaio 2 foi bastante superior ao dos do Ensaio 1. Em termos gerais, quanto maior for o número de tratamentos incluídos num teste de comparações de médias, menor será o poder das conclusões retiradas do mesmo. A escolha do procedimento de Bonferroni para este grupo de tratamentos, foi no sentido de mitigar os efeitos deste fenómeno associado a comparações múltiplas (Jorge Cadima e Elsa Gonçalves, comunicação pessoal), que se tende a verificar com maior intensidade, quanto maior for o número de comparações efetuadas.

Verificou-se que a aplicação do método de Bonferroni resultou num aumento do número de rejeições da hipótese de não haver diferenças entre tratamentos, em concordância com os valores de severidade e incidência evidenciados nos gráficos dos valores médios, por outras palavras, previamente à aplicação do método haviam óbvias diferenças entre tratamentos que não estavam a ser detetadas.

Para comprovar os efeitos da comparação de múltiplos tratamentos, realizaram-se os testes referidos para cada par de tratamentos que se queria comparar, em vez de englobar os dados numa só análise. Verificaram-se rejeições de H_0 (a hipótese de não existência de diferenças) num maior número de casos, reforçando a ideia de que ocorreu um erro estatístico resultante do elevado número de comparações englobadas numa só análise. Contudo, este procedimento verifica-se muito dispendioso em termos de tempo e, como consequência, impraticável para todos os tratamentos.

5.1. Ensaio 1 (Alenquer)

Nas seguintes figuras apresentam-se os gráficos de severidade, incidência e comprimento da necrose com base nos dados resultantes das inoculações com *Pa. chlamydospora* e *N. parvum* no Ensaio 1. Para apoiar certas afirmações feitas relativamente aos resultados de severidade e comprimento da necrose também se apresentam os valores da sua dispersão sob a forma de caixa-de-bigodes. Para os valores de incidência não se efetuou caixa-de-bigodes pois estes foram calculados com base em apenas dois valores: presença ou ausência do fungo.

Na Fig. 5.1, que se refere à severidade da doença causada por *N. parvum* houve diferenças significativas para os tratamentos com Tri-Wall (p-value “0,00”) e Esquive (p-value “0,00”) quando comparados ao “Não

tratado, com inoculação” com valores médios de 8,9%, 13,9% e 47,5%, respectivamente. Não foram detetadas diferenças entre o Tri-Wall e o Esquive (p-value “0,55”). O controlo negativo “Não tratado, sem inoculação” apresentou valores nulos de severidade e de incidência. Consultar, no Anexo A, o Quadro 8.1 para informação mais detalhada sobre a análise estatística usada.

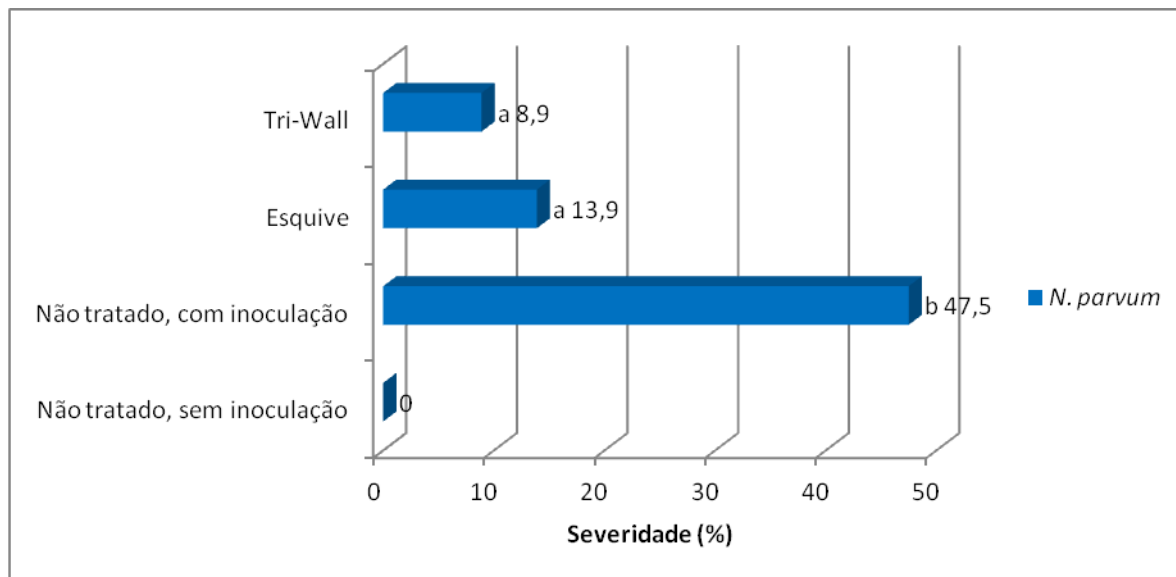


Fig. 5.1 – Valores médios de severidade da doença causada por *N. parvum* após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Por observação da Fig. 5.2, não se verificou a ocorrência de “observações atípicas”. Os valores de severidade após o tratamento com Tri-Wall variaram entre 0 e 40%, aproximadamente. Contudo, das 30 repetições, 15 contribuíram com valor praticamente nulo de severidade, o que explica o valor de severidade média já referido. No caso dos tratamentos com Esquive houve na mesma oscilação de severidade entre os valores de 0 a 40%, estando esta distribuída de forma equilibrada por 75% das observações, e, desta vez, apenas 25% das repetições apresentaram valores nulos. Comparativamente, o “Não tratado, com inoculação” apresentou uma maior dispersão de valores oscilando entre 0 e 100% de severidade. Observa-se, pela Fig. 5.2, que esta distribuição foi relativamente equilibrada pelos vários quartis. O controlo negativo, como referido anteriormente, apresentou valores nulos.

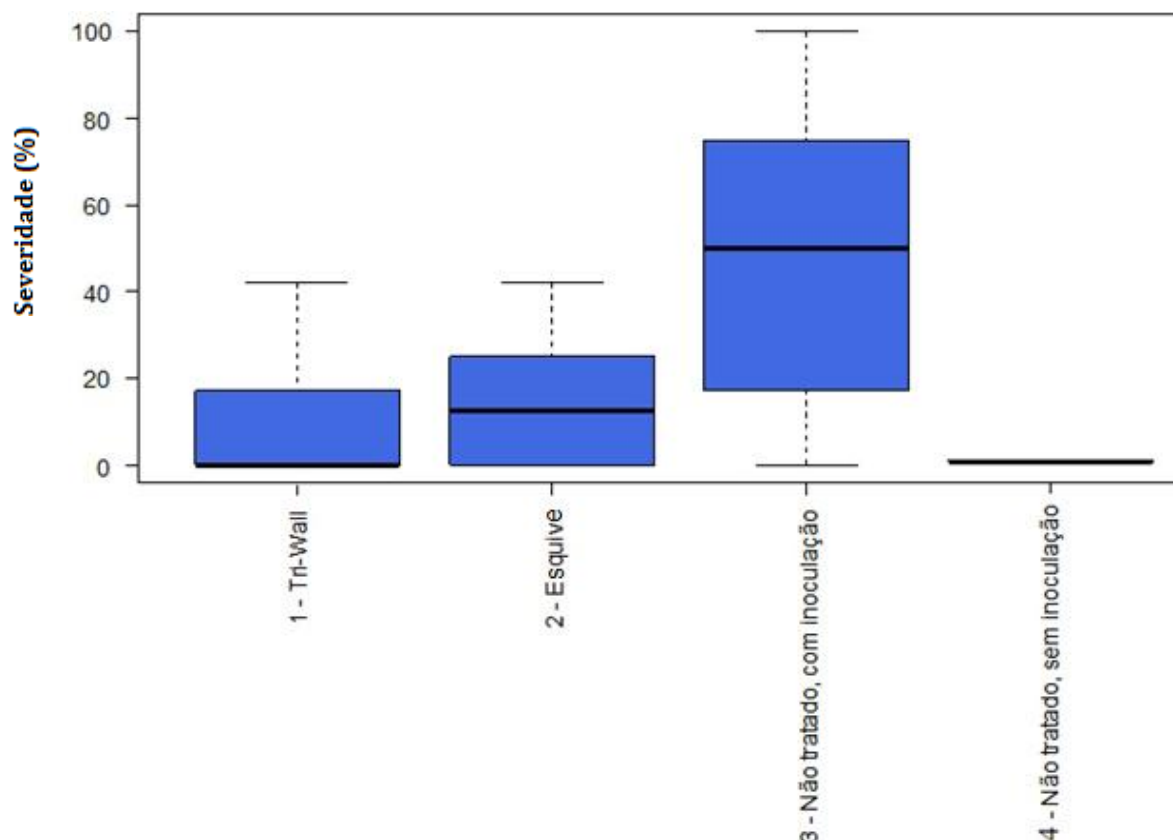


Fig. 5.2 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade causada por *N. parvum* nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.

Na Fig. 5.3, que diz respeito à incidência da doença causada por *N. parvum*, verificou-se, mais uma vez, a existência de diferenças entre os tratamentos com Tri-Wall e Esquive quando comparados com o “Não tratado, com inoculação” com valores de 43,3% e 53,3% das repetições contaminadas contra ocorrência de contaminações na ordem dos 90,0% de repetições, respectivamente. Entre o Tri-Wall e o Esquive não houve diferenças significativas, ainda que o valor médio do primeiro tenha sido inferior ao do segundo. O controlo negativo “Não tratado, sem inoculação” não apresentou valores de incidência. Consultar, no Anexo A, o Quadro 8.2 para informação mais detalhada sobre a análise estatística efetuada.

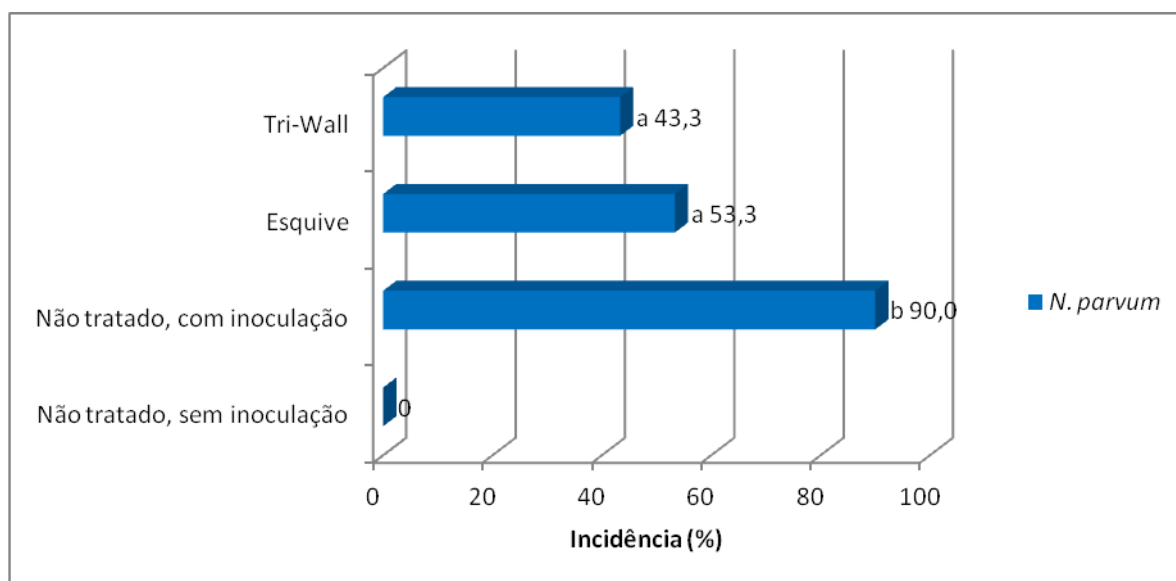


Fig. 5.3 - Valores médios de incidência da doença causada por *N. parvum* após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

No caso de *N. parvum* (Fig. 5.4) não houve diferenças significativas no comprimento da necrose quando comparados os tratamentos com Tri Wall (p-value “0,19”) e Esquive (p-value “0,71”) ao controle positivo “Não tratado, com inoculação”, nem quando comparados entre si (p-value “0,57”), com valores de 1,6 cm, 2,0 cm e 2,0 cm, respectivamente. Pela Fig. 5.5 verifica-se a ocorrência de uma “observação atípica” no tratamento com Tri-Wall, que, quando eliminada, acarretou numa redução do valor médio de comprimento de necrose para 1,4 cm, observável na Fig. 5.4. Com isto, foi efetuada a análise estatística removendo esta observação e, ainda assim, considerou-se a não existência de diferença significativa entre este tratamento e os restantes com um p-value “0,05” quando comparado ao “Não tratado, com inoculação” e “0,26” quando comparado ao com Esquive. Não ocorreram necroses internas no controle negativo. Consultar no Anexo A, o Quadro 8.3 e Quadro 8.4 para informação mais detalhada sobre a análise utilizada.

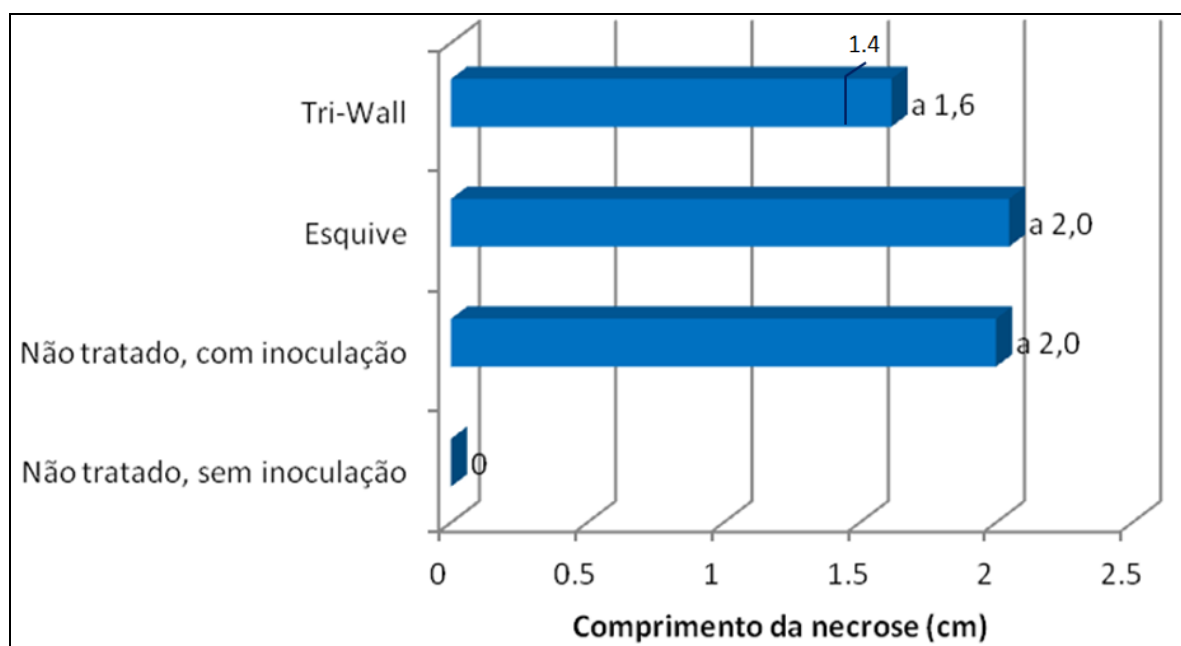


Fig. 5.4 - Comprimento da necrose da doença causada por *N. parvum* após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Uma análise da Fig. 5.5 permite-nos ter uma noção algo mais detalhada das diferenças entre os vários tratamentos. No tratamento com Tri-Wall verifica-se que 1/4 das observações se encontram entre os 0 e os 0,3cm, o segundo quartil é representado por observações entre os 0,3 e 1,1cm, enquanto o terceiro quartil se encontra entre os 1,1 e os 2,8cm. As restantes observações alcançavam até aos 4,2cm, com a exceção da com 5,8cm que constituía a observação atípica. No tratamento com Esquive os quartis dividiam-se entre os 0 e os 0,7cm, os 0,7 e os 1,9cm, os 1,9 e os 3cm, e o último entre os 1,9 e os 5,2cm. No “Não tratado, com inoculação” a amplitude de valores compreendeu-se entre os 1,2cm e os 4,6cm sendo os valores que dividiam os quartis de 1,5cm, 2,3cm e 3,4cm. Ainda que seja possível distinguir alguma diferença entre o Esquive e o “Não tratado, com inoculação” como, por exemplo, a maior amplitude de valores do primeiro e o facto de o 1º quartil conter valores inferiores ao 1º quartil do segundo, os restantes 75% de observações encontrou-se distribuída por quartis com gamas de valores semelhantes aos do “Não tratado, com inoculação”. No Tri-Wall as diferenças são mais significativas, daí o valor médio inferior. Pelo menos 2/4 das observações apresentaram valores inferiores a qualquer gama de valores do “Não tratado, com inoculação”. Estes resultados foram, ainda assim, contraditos pela ANOVA, pois, mesmo com a remoção da “observação atípica” com valor de 5,8cm, resultou num p-value de “0,05”, que, apesar de bastante mais reduzido, suporta a hipótese da não existência de diferenças quando feito o teste de Tukey para comparar estes tratamentos.

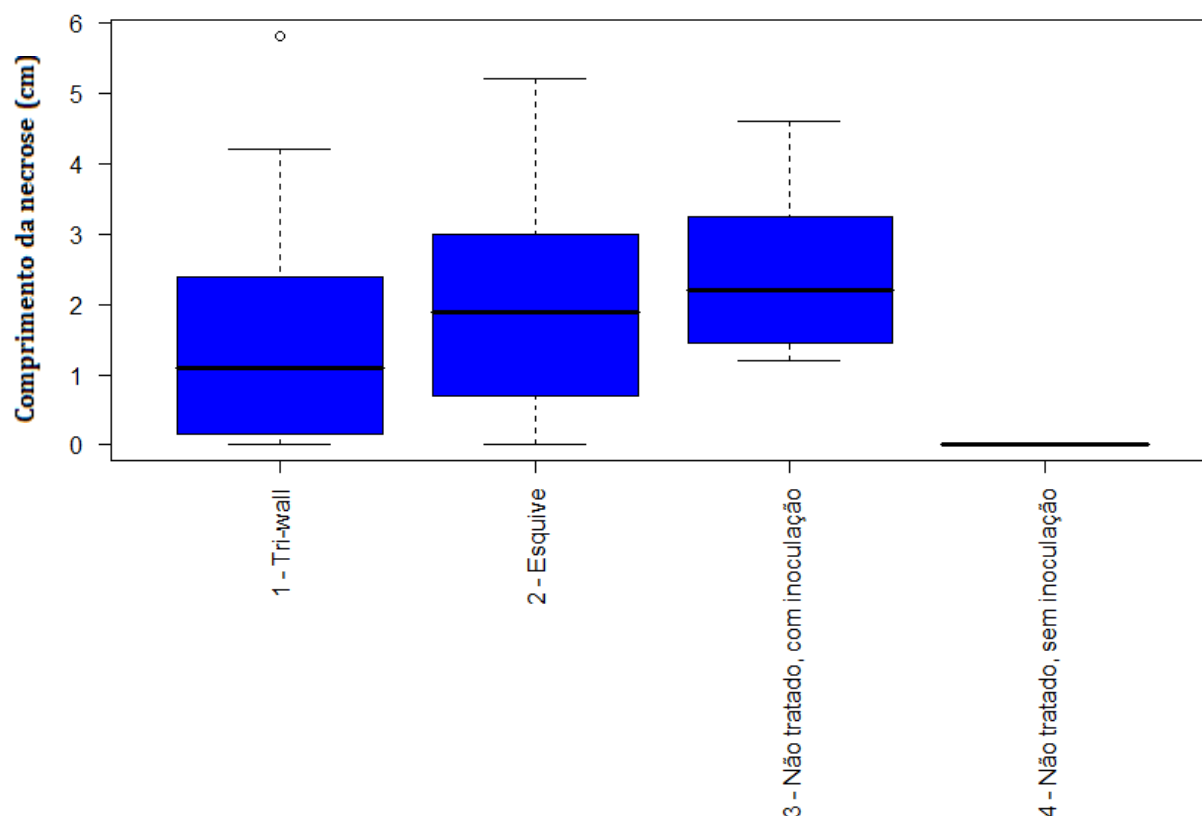


Fig. 5.5 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores do comprimento da necrose (cm) causada por *N. parvum* nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.

Pela análise da Fig. 5.6, relativa à severidade da doença causada por *Pa. chlamydospora*, pôde-se verificar a existência de diferenças, estatisticamente comprovadas, entre os tratamentos com Tri-Wall e Esquive quando comparados ao “Não tratado, com inoculação” com valores de 2,8%, 4,4% e 19,7%, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre o Tri-Wall e Esquive. O controle negativo “Não tratado, sem inoculação” não apresentou valores de severidade. Consultar Anexo A, Quadro 8.5 para informação mais detalhada sobre o tipo de análise efetuada.

Pôde-se verificar que o isolado de *N. parvum* resultou em severidade da doença mais elevada para todos os tratamentos, possivelmente, pela sua maior virulência. Além disso, o fungo *Pa. chlamydospora* caracteriza-se por um crescimento mais lento.

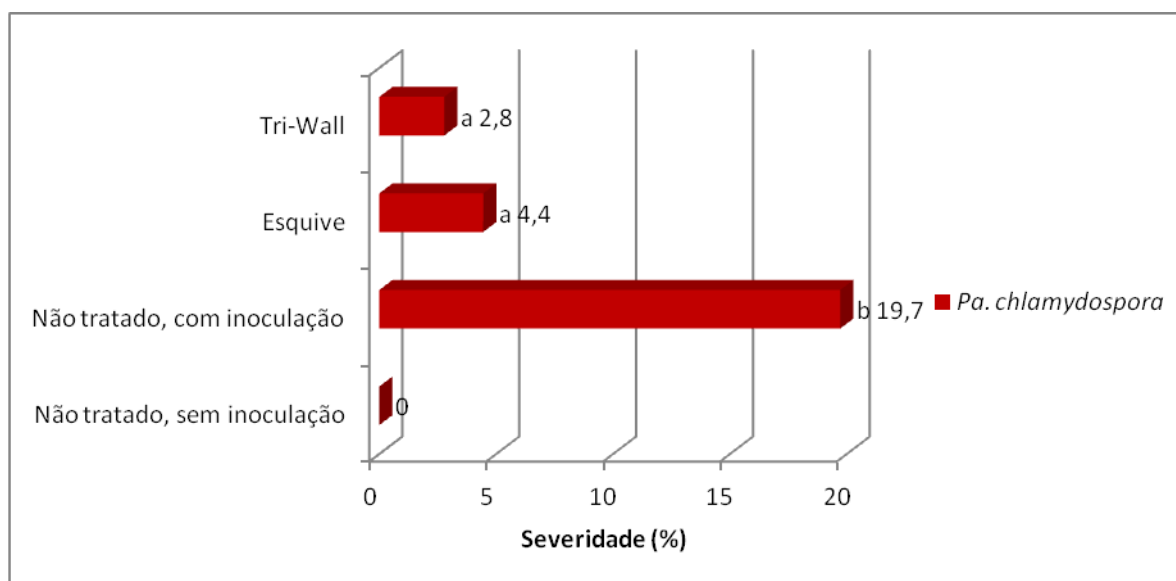


Fig. 5.6 - Valores médios de severidade da doença causada por *Pa. chlamydospora* após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

A grande maioria das repetições com Tri-Wall e Esquive apresentaram valores de severidade próximos de zero (Fig. 5.7), sendo os valores das repetições com severidade superior a 0% considerados como *atípicos*. Assim, os valores médios de severidade apresentados na Fig. 5.6, para os tratamentos com Tri-Wall e Esquive são resultado das “observações atípicas”, ou seja, a severidade da doença foi muito reduzida. Isto sugere considerável eficácia por parte de ambos quando comparados com o “Não tratado, com inoculação”, que, por sua vez, apresentou valores de severidade variando entre 0 e 70 %, aproximadamente. No caso do “Não tratado, com inoculação” deve, contudo, ser referido que 15 das 30 repetições apresentaram valores de severidade inferiores a 10%, estando as restantes 15 compreendidas entre 10% e 70%. Interpretando de outra forma, 75% das observações apresentaram valores de severidade inferiores a 35%, sendo que os restantes 25% de observações corresponderam aos valores de severidade entre 35% e 70%.

Com estas observações, considerou-se desnecessário realizar novamente a análise estatística removendo as “observações atípicas” uma vez que tal feito apenas iria confirmar os resultados já obtidos, ou seja, houve diferenças significativas quando comparados o Tri-Wall e o Esquive ao “Não tratado, com inoculação” e não houve diferenças significativas entre o Tri-Wall e o Esquive.

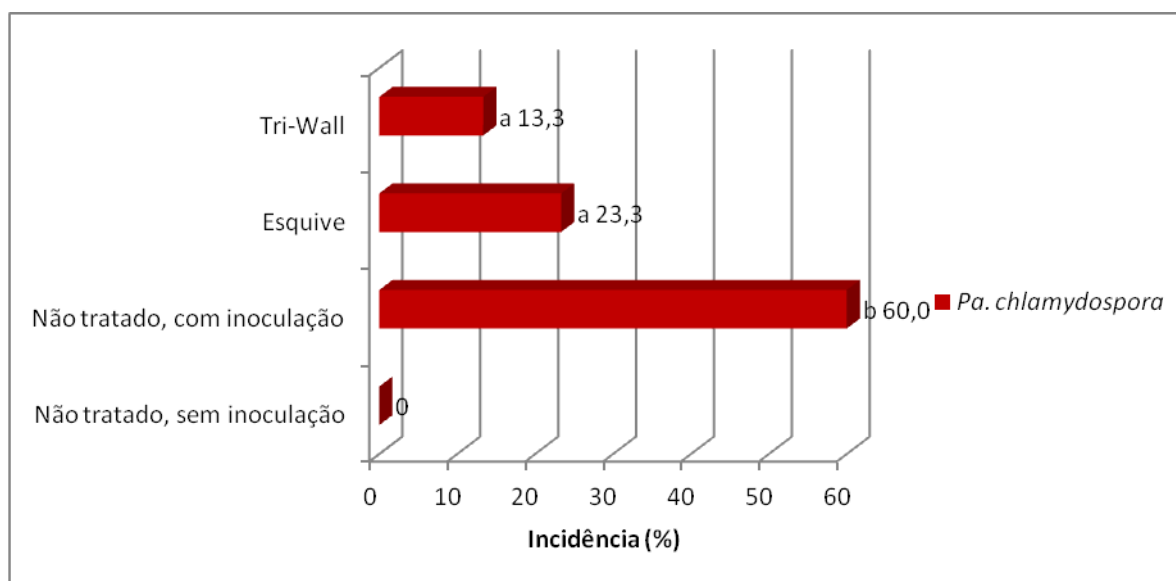


Fig. 5.8 - Valores médios de incidência da doença causada por *Pa. chlamydospora* após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

No caso das varas inoculadas com *Pa. chlamydospora* (Fig. 5.9), o comprimento da necrose não revelou, numa primeira análise, diferenças significativas quando comparadas as varas tratadas com Esquive e o “Não tratado com inoculação” (p-value “0,12”), apesar da diferença entre os valores médios 2,5 cm para o Esquive e 3,8 cm para o “Não tratado, com inoculação”. O Tri-Wall, contudo, pareceu distinguir-se de ambos o Esquive (p-value “0,04”) e o “Não tratado, com inoculação” (p-value “0,00”) com 0,9 cm de comprimento de necrose. O controlo negativo não apresentou necroses nos tecidos internos. Consultar Anexo A, Quadro 8.7 para uma informação mais detalhada quanto ao tipo de análise usada.

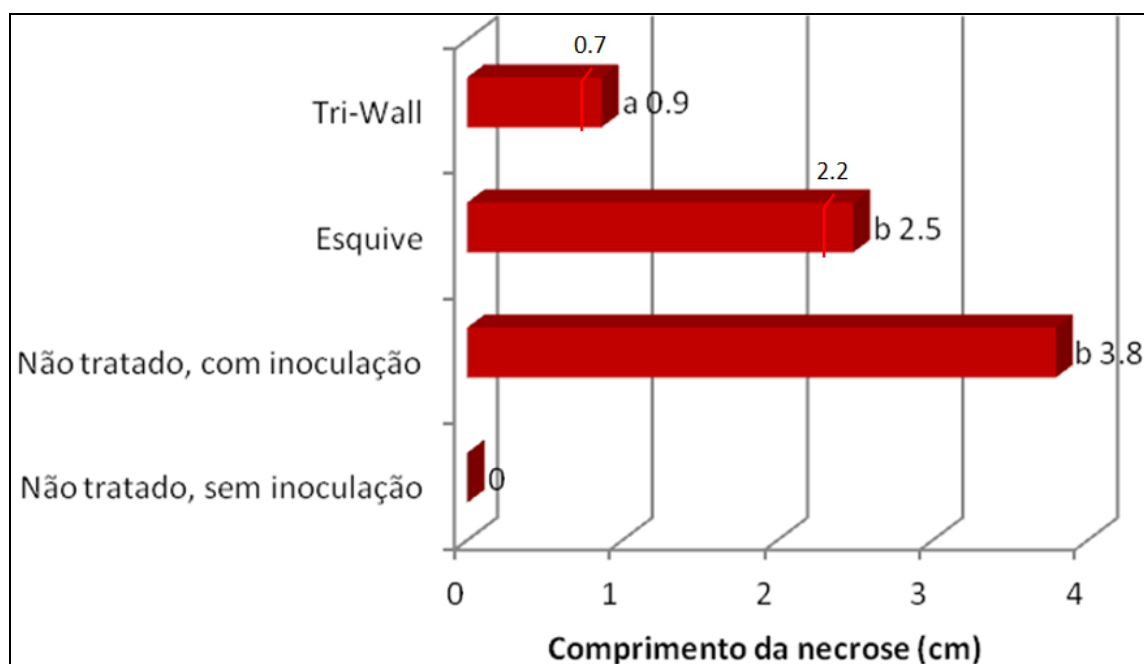


Fig. 5.9 – Comprimento da necrose da doença causada por *Pa. chlamydospora* após os vários tratamentos no Ensaio 1. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Estes resultados foram, contudo, resultado da inclusão de “observações atípicas” na ANOVA. Estas podem ser observadas na Fig. 5.10 com valores de 4cm e 9cm para o Tri-Wall e Esquive, respetivamente. Foi avaliada a influência destas nos resultados obtidos e verificou-se uma redução dos valores médios do comprimento da necrose para 0,7 e 2,2 cm desde 0,9 e 2,5 cm (Fig. 5.9). Com isto, foi detetada diferença entre as três modalidades de tratamento, ou seja, o Esquive passou a apresentar também uma diferença significativa comparativamente ao “Não tratado, com inoculação” com um p-value de “0,02”. Consultar no Anexo A, o Quadro 8.8 para informação mais detalhada sobre a análise usada.

Pela dispersão dos dados do comprimento da necrose, na Fig. 5.10, verifica-se diferenças nos vários tratamentos. No caso do tratamento com Tri-Wall, os valores para o 1º quartil, mediana, 3º quartil e 4º quartil foram respetivamente de 0,3cm, 0,5cm, 0,9cm e 1,90cm. Para o Esquive estes foram 0,45cm, 2,30cm, 2,50cm e 6,30cm e para o “Não tratado, com inoculação” 1,6cm, 4,6cm, 5,9cm e 7,9cm, respetivamente. A totalidade das observações do Tri-Wall foram inferiores à mediana do Esquive e este último, caracterizou-se por 75% das suas observações inferiores à mediana do “Não tratado, com inoculação”. No caso do “Não tratado, sem inoculação” a dispersão foi 0cm para todas as repetições.

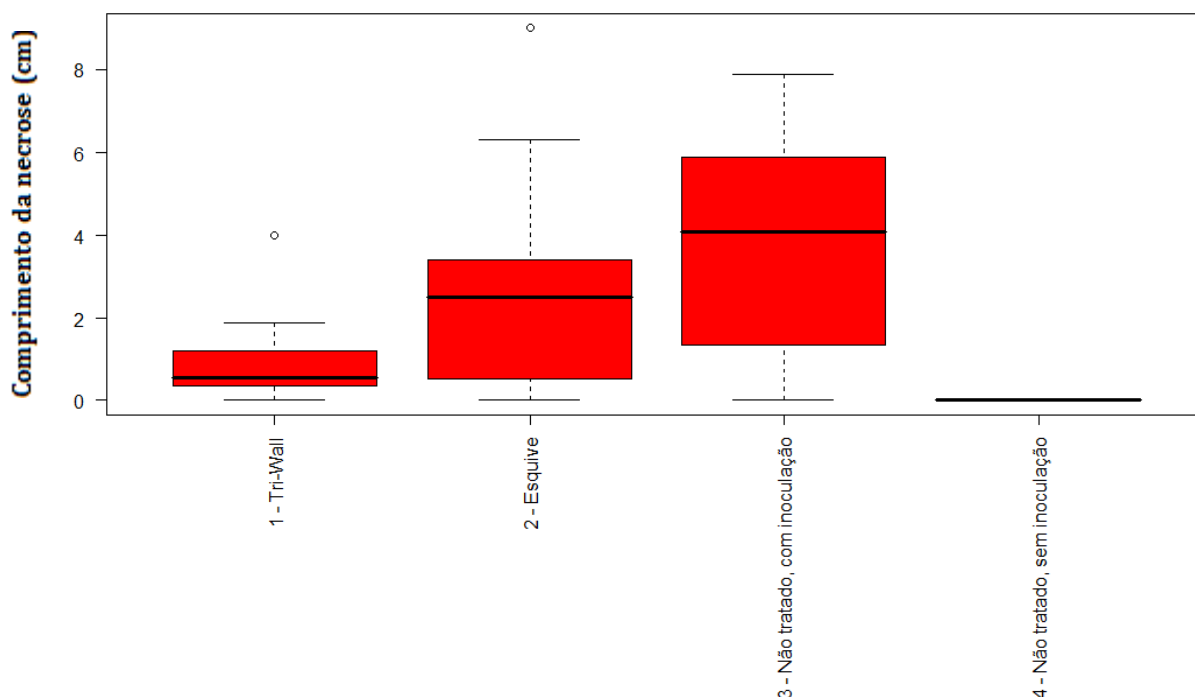


Fig. 5.10 – Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores do comprimento da necrose (cm) causada por *Pa. chlamydospora* nas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 1.

Como pode ser consultado no Quadro 5.1, as modalidades com *Neofusicoccum parvum* inoculada foram as únicas aonde a severidade foi maior no Nível 3 de isolamento, já que, nas restantes modalidades, e mesmo no Ensaio 2, em média, o Nível 3 apresentou menor percentagem de reisolamentos. O Nível 3, que é a zona mais próxima da zona de poda, é aonde a madeira tende a secar primeiro o que resulta, geralmente, numa redução dos reisolamentos de fungos a partir desta zona. De notar também que, em geral, os tratamentos com Tri-Wall apresentaram menores percentagens de reisolamentos do que os com Esquive, ou mesmo do que a modalidade sem aplicação de pesticida “Não tratado, com inoculação”. Não foi incluído um quadro com influência da remoção de “observações atípicas” já que estas não afetaram os resultados da análise estatística.

Quadro 5.1 - Reisolamento (%) de *N. parvum* e *Pa. chlamydospora* por nível do talão nas videiras do Ensaio 1.

Tratamento	Reisolamento de <i>N. parvum</i> (%) no Ensaio 1			Reisolamento de <i>Pa. chlamydospora</i> (%) no Ensaio 1		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Não tratado, sem inoculação	0	0	0	0	0	0
Não tratado, com inoculação	42,5	41,7	58,3	20,8	20,0	18,3
Esquive	10,0	10,8	20,8	1,7	8,3	3,3
Tri-Wall	7,5	9,2	10,0	5,8	1,7	0,8
Média	20,0	20,6	29,7	9,4	10,0	7,5

5.2. Ensaio 2 (Arruda dos Vinhos)

Perímetro e comprimento das varas e dos entrenós

Um dos parâmetros medidos, no caso particular das vinhas do Ensaio 2 (as da casta Pinot Noir), foi o do perímetro e comprimento das varas e dos entrenós. O perímetro das varas foi medido, em centímetros, em termos da circunferência que as circunscrevia, o comprimento dos entrenós refere-se à medida longitudinal, em centímetros, dos vários segmentos da vara. Esta medida permite ter a noção da semelhança entre as varas usadas nos vários tratamentos. Em média, estas atingiram um perímetro de 2,9cm, para ambos os grupos de inoculações (Quadro 5.2 e Quadro 5.3), com mínimo de 2,8cm e máximo de 3,0cm.

Pelo Quadro 5.2 e Quadro 5.3 verificou-se que o comprimento das varas onde foi efetuado o estudo era bastante semelhante. Entre as varas inoculadas com *N. parvum* e *Pa. chlamydospora*, os comprimentos médios desde o corte ao 1º gomo, do 1º ao 2º gomo, e do 2º gomo até à base foram 3,0cm, 5,7cm e 4,0cm, para as videiras inoculadas com o primeiro fungo, e 2,4cm, 5,1cm e 3,6cm para as videiras inoculadas com o segundo fungo.

Como valores mínimos, para as varas inoculadas com *N. parvum* (Quadro 5.2), foi possível destacar 2,2cm, 4,6cm e 2,7cm e máximos de 4,0cm, 6,7cm e 4,8cm para os vários segmentos na ordem representada no quadro. Nas vinhas inoculadas com *Pa. chlamydospora* (Quadro 5.3) e pela ordem representada no quadro, os mínimos foram 1,1cm, 3,1cm e 1,4cm, todos relativos às varas tratadas com difenoconazol, enquanto os máximos foram 3,8cm, 6,7cm e 5,1cm.

Quadro 5.2 – Perímetro e comprimento das varas e dos entrenós das vinhas do Ensaio 2 inoculadas com *N. parvum*.

Tratamento	Casta Pinot Noir			
	Perímetro (cm)	Comprimento desde o corte ao 1º gomo (cm)	Comprimento entre o 1º e o 2º gomo (cm)	Comprimento desde o 2º gomo até à base (cm)
Não tratado, sem inoculação	2,8	2,4	6,4	4,8
Não tratado, com inoculação	3,0	4,0	4,8	2,7
BAS 516 BX F	2,8	3,2	6,8	5,2
BAS 516 BZ F	2,8	3,4	5,2	3,4
BAS 516 BY F	2,8	2,8	6,1	4,3
BAS 516 CA F	2,8	2,2	6,7	5,0
BAS 516 AJ F	2,8	3,5	5,0	3,0
BAS 516 CF F	2,9	2,7	4,6	3,3
BAS 516 CG F	3,0	3,2	4,7	3,2
difenoconazol (Score®)	2,8	2,4	6,4	4,8
Média total	2,9	3,0	5,7	4,0

Quadro 5.3 - Perímetro e comprimento das varas e dos entrenós das vinhas do Ensaio 2 inoculadas com *Pa. chlamydospora*.

Tratamento	Casta Pinot Noir			
	Perímetro (cm)	Comprimento desde o corte ao 1º gomo (cm)	Comprimento entre o 1º e o 2º gomo (cm)	Comprimento desde o 2º gomo até à base (cm)
Não tratado, sem inoculação	2.8	2.4	6.4	4.8
Não tratado, com inoculação	2.9	2.5	6.4	4.8
BAS 516 BX F	2.8	2.2	5.3	4.1
BAS 516 BZ F	2.8	2.9	5.0	3.1
BAS 516 BY F	2.8	3.8	5.4	3.3
BAS 516 CA F	2.9	2.8	4.6	3.0
BAS 516 AJ F	3.0	2.4	4.2	3.1
BAS 516 CF F	2.9	1.8	6.7	5.1
BAS 516 CG F	3.1	1.8	3.6	2.9
difenoconazol (Score®)	3.2	1.1	3.1	1.4
Média total	2.9	2.4	5.1	3.6

Segundo o Quadro 5.4, o comprimento total das varas atingiu valor médio de 12,6cm para as varas inoculadas com *N. parvum*, com valor máximo de 15,2cm, respetivo às varas onde o BAS 516 BX F foi testado e mínimo de 10,6cm, valor respeitante às varas a serem testadas com BAS 516 CF F. Como valor médio para as inoculadas com *Pa. chlamydospora* temos 11,0cm de comprimento, com máximo de 13,7cm, respetivo às varas do tratamento “Não tratado, com inoculação” e mínimo de 5,7cm nas varas tratadas com difenoconazol.

Quadro 5.4 – Comprimento total das varas (cm) inoculadas com *N. parvum* e *Pa. chlamydospora*.

Tratamento	Comprimento total das varas (cm)	
	Inoculações de <i>N. parvum</i>	Inoculações de <i>Pa. chlamydospora</i>
Não tratado, sem inoculação	13,6	13,6
Não tratado, com inoculação	11,5	13,7
BAS 516 BX F	15,2	11,6
BAS 516 BZ F	12,0	11,0
BAS 516 BY F	13,1	12,5
BAS 516 CA F	13,9	10,4
BAS 516 AJ F	11,5	9,7
BAS 516 CF F	10,6	13,6
BAS 516 CG F	11,1	8,4
difenoconazol (Score®)	13,6	5,7
Média total	12,6	11,0

Efeito dos tratamentos nas inoculações com *N. parvum*

Pela análise da Fig. 5.11, os tratamentos que apresentaram diferença significativa do “Não tratado, com inoculação” (78,9%) foram o BAS 516 AJ F (30,8% e p-value “0,00”), o BAS 516 BX F (21,7% e p-value “0,00”), o BAS 516 BY F (25,3% e p-value “0,00”), o BAS 516 CG F (24,2% e p-value “0,00”) e o difenoconazol (4,7% e p-value “0,00”). O par BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação apesar de considerado estatisticamente não diferente, apresentou um p-value de “0,08”, valor este que sugere a existência de diferenças se não fosse o erro estatístico derivado das comparações múltiplas. Além disso, a realização da análise estatística (Fig. 5.11) removendo as “observações atípicas” verificadas na Fig. 5.12 detetou a existência de diferenças entre os dois tratamentos (p-value “0,01”). Ainda assim, esta diferença não foi tão acentuada como nos tratamentos mencionados. Pela Fig. 5.11, apesar dos valores de severidade, sem “observações atípicas”, terem sido diferentes para o “Não tratado, com inoculação” (84,4%), BAS 516 BY F (14,4%), BAS 516 CG F (15,7%) e difenoconazol (3,0%), em termos estatísticos, esta análise confirmou os resultados já observados para os vários grupos de comparações, permitindo concluir que estas “observações atípicas” apenas afetaram os resultados obtidos para o par BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação, para o qual se verificou haver, de facto, diferenças pelo valor de p-value de “0,01”. Consultar no Anexo B, o Quadro 8.9 e Quadro 8.10 para informações mais detalhadas sobre a análise utilizada.

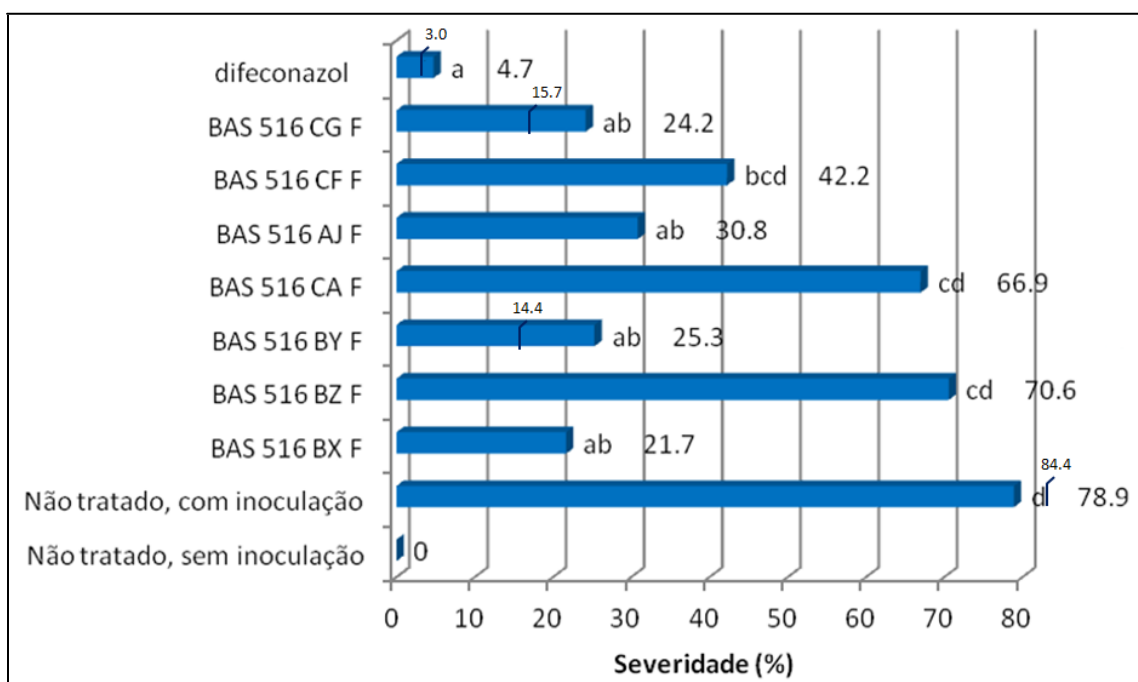


Fig. 5.11 - Severidade da doença causada por *N. parvum* após os vários tratamentos em Arruda dos Vinhos. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Na Fig. 5.12, os tratamentos BAS 516 CA F e BAS 516 BZ F possuem pelo menos $\frac{1}{4}$ de observações com 100% de severidade. Em ambos houve observações com severidade de 0% a 100%, contudo, no BAS 516 BZ F houve $\frac{1}{2}$ de observações com 100% de severidade, $\frac{1}{4}$ entre $\approx 33\%$ e os 100%, e $\frac{1}{4}$ entre 0% e \approx

33%. No BAS 516 CA F $\frac{1}{4}$ foi entre $\approx 80\%$ e 100% , $\frac{1}{4}$ entre, $\approx 33\%$ e $\approx 80\%$ e $\frac{1}{4}$ entre 0% e $\approx 33\%$. Esta distribuição apoia a detecção de semelhanças entre estes tratamentos e o “Não tratado, com inoculação”. Que por sua vez apresentou severidades acima de $\approx 33\%$ com duas observações “atípicas” de 0% de severidade. Neste tratamento houve $\frac{1}{4}$ de observações com valores de $\approx 33\%$ a $\approx 67\%$ de severidade, $\frac{1}{4}$ entre 67% e 83% e $\frac{1}{4}$ entre 83% e 100% .

O tratamento BAS 516 CF F apresentou severidades entre os 0% e os 100% , contudo, é natural que se tenha mostrado estatisticamente diferente do “Não tratado, com inoculação” já que $\frac{1}{2}$ das suas observações atingiram valores de severidade numa gama inferior à do último. Esta diferença só pôde ser confirmada removendo as várias “observações atípicas” da análise estatística.

No caso dos tratamentos BAS 516 AJ F e BAS 516 BX F houve semelhança na distribuição de valores de severidade com $\frac{1}{2}$ das observações apresentando valores de 0% de severidade, $\frac{1}{4}$ entre os 0% e $\approx 67\%$ e as restantes entre $\approx 67\%$ e 100% . Isto confirmou as diferenças estatísticas anteriormente referidas quando comparados com o “Não tratado, com inoculação”. Também houve semelhança na distribuição de severidade dos tratamentos BAS 516 CG F e BAS 516 BY F. O primeiro apresentou três observações “atípicas” e o segundo quatro, todas com 100% de severidade. Em ambos os tratamentos houve $\frac{1}{4}$ de observações com 0% de severidade, $\frac{1}{4}$ entre os 0% e $\approx 17\%$, $\frac{1}{4}$ entre $\approx 17\%$ e $\approx 33\%$, e $\frac{1}{4}$ entre $\approx 33\%$ e $\approx 75\%$ de severidade. Ou seja, $\frac{3}{4}$ das observações foram fora da gama dos valores de severidade observados no “Não tratado, com inoculação”.

Por fim, o tratamento com difenoconazol caracterizou-se por todas as observações com severidade inferior a $\approx 30\%$, sendo os valores de severidade destes próximos de 0% , estando as restantes compreendidas entre 0% e $\approx 20\%$, ou seja, todos os valores são inferiores aos do “Não tratado, com inoculação”. As únicas duas observações superiores a $\approx 20\%$ foram consideradas “atípicas”.

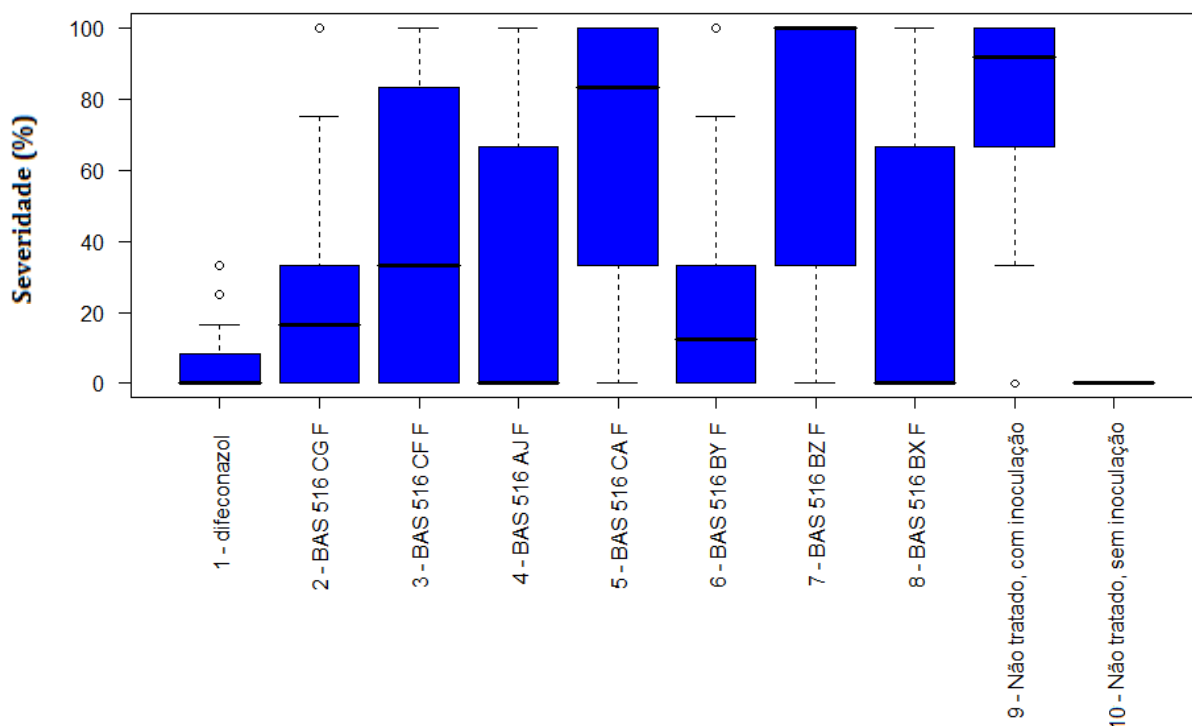


Fig. 5.12 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade causada por *N. parvum* pelas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 2.

Pela Fig. 5.13, que apresenta os valores de incidência, os tratamentos que diferiram do “Não tratado, com inoculação” foram o BAS 516 AJ F (46,7%), o BAS 516 BX F (36,7%) e o difenoconazol (26,7%). Numa primeira análise, os tratamentos BAS 516 BY F (56,7%) e BAS 516 CG F (53,7%) foram considerados estatisticamente semelhantes ao “Não tratado, com inoculação” com p-value de “0,13” e “0,06”, respectivamente. Estes valores foram baixos, uma vez mais sugerindo que a rejeição de diferença destes foi apenas devido ao elevado número de comparações considerada na análise estatística e, assim, ao consequente erro associado. Os pares que também exibiram diferenças entre si foram o BAS 516 CF F-difenoconazol, BAS 516 CA F-difenoconazol, BAS 516 BZ F-difenoconazol e BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F. Os pares BAS 516 BX F-BAS 516 CA F, BAS 516 BX F-BAS 516 CF F e BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F obtiveram valores de p-value bastante baixos “0,06”, “0,13” e “0,13”, respectivamente, suscitando dúvidas sobre a não aceitação de diferenças entre estes pares de tratamentos. Consultar no Anexo B, o Quadro 8.13 para informação mais detalhada sobre a análise utilizada.

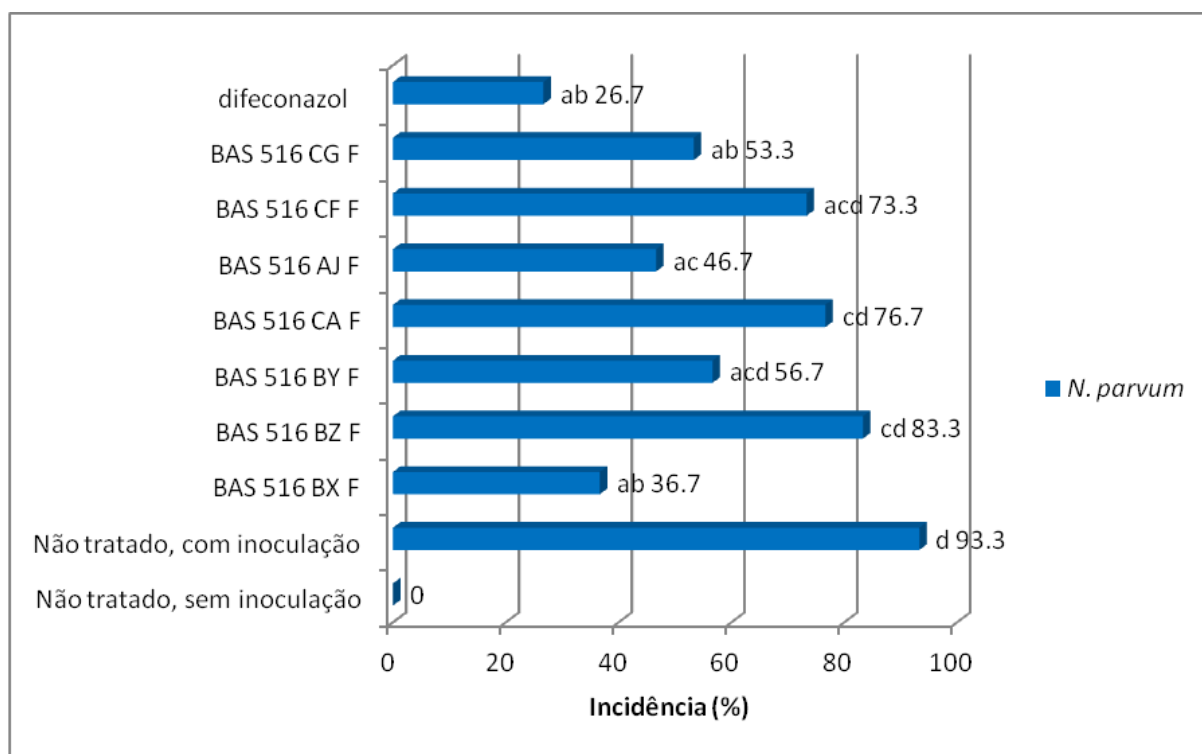


Fig. 5.13 - Incidência da doença causada por *N. parvum* após os vários tratamentos no Ensaio 2. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Efeito dos tratamentos nas inoculações com *Pa. chlamydospora*

A análise da Fig. 5.14, aliada aos dados estatísticos, indicou que os tratamentos significativamente diferentes do “Não tratado, com inoculação” (severidade de 12,8%) foram o BAS 516 BX F (1,8% e p-value de “0,00”), o BAS 516 CF F (3,6% e p-value “0,02”) e o BAS 516 AJ F (3,9% e p-value “0,03”). Contudo, o tratamento BAS 516 BY F (inicialmente 7,2% e p-value de “0,68”) também revelou diferenças porque ao realizar-se a análise estatística sem “observações atípicas” verificou-se a influência que a eliminação destes valores teve no valor médio da severidade (diminuição para 3,2% e p-value de “0,03”). Com o difenoconazol (4,2%) também se passou o mesmo, não tendo demonstrado diferenças numa primeira análise estatística pelo p-value de “0,10”, contudo, após a remoção das “observações atípicas” considerou-se a existência de diferenças com um p-value de “0,02”. O par BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F foi o único que mostrou diferenças significativas entre si com a presença (p-value de “0,02”) ou ausência das “observações atípicas” (p-value de “0,00”).

Ainda que o teste de Kruskal tenha indicado a não existência de diferenças de severidade entre os restantes pares de tratamentos, os pares BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F (p-value de “0,16”), BAS 516 BX F-BAS 516 CA F (p-value de “0,06”), BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F (p-value de “0,13”), BAS 516 CA F-BAS 516 CF F (p-value de “0,37”) e BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F (p-value de “0,45”), BAS 516 BZ F-difenoconazol (p-value de “0,43”) apresentaram valores de p-value particularmente baixos o que gera incerteza quanto à possibilidade de a rejeição de diferenças entre estes não ter sido um erro estatístico derivado do elevado número de comparações e da influência das “observações atípicas”. Até porque os dados estatísticos

resultantes da eliminação das “observações atípicas” (Fig. 5.14) caracterizaram-se por p-vaues para os seis pares de tratamentos referidos de “0,06”, “0,00”, “0,04”, “0,16”, “0,2” e “0,09”, respetivamente. Ou seja, a remoção das “observações atípicas” resultou, desta vez, numa deteção de diferenças para o segundo e terceiro par de tratamentos referidos, sendo que, para os restantes pares, houve um decréscimo no valor de p-value que, apesar de não ser baixo o suficiente para considerar a existência de diferenças entre eles, nos dá informações suficientes para considerar a hipótese de que o elevado número de comparações resultou na não deteção de diferenças quando na verdade deveria ter sido detetada, pelo menos para o primeiro e último par referidos, pois foram os que tiveram o valor de p-value mais baixo.

Verificou-se que a severidade da doença causada por *Pa. chlamydospora* foi em todos os tratamentos menor do que a de *N. parvum*, possivelmente devido ao lento crescimento do primeiro fungo comparativamente ao segundo. Consultar no Anexo B, o Quadro 8.11 e Quadro 8.12 para informação mais detalhada sobre a análise utilizada.

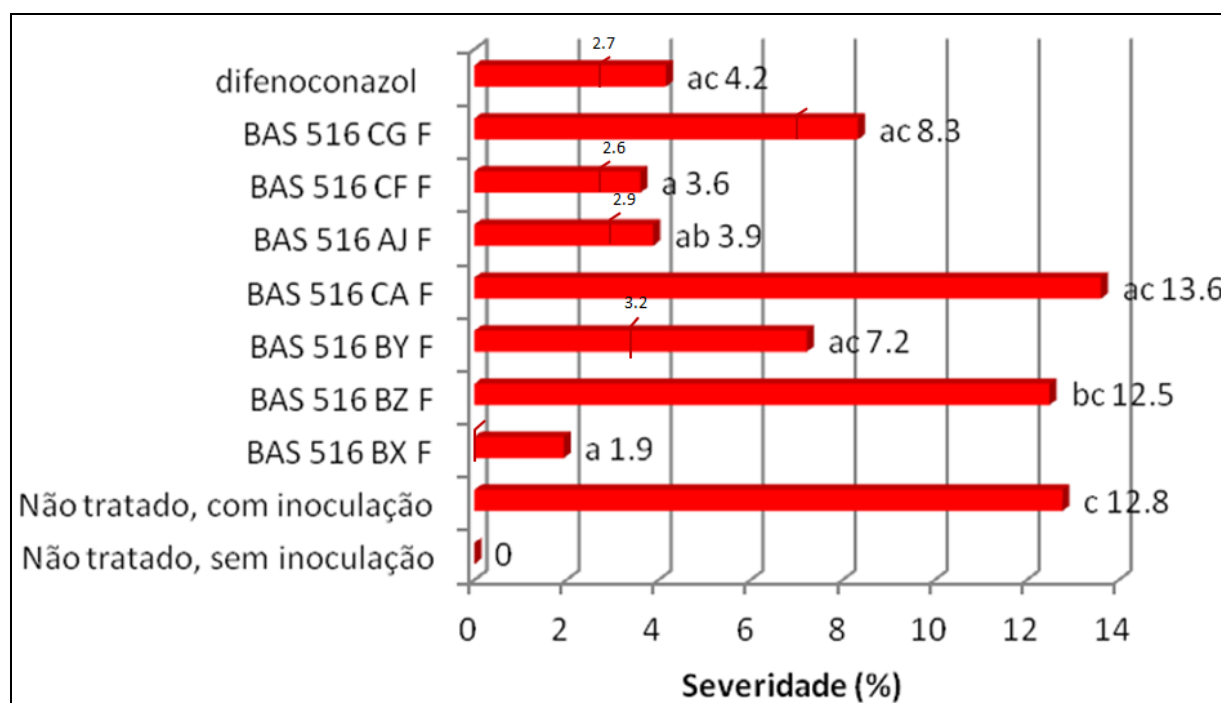


Fig. 5.14 - Severidade da doença causada por *Pa. chlamydospora* após os vários tratamentos em Arruda dos Vinhos. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Na Fig. 5.15, que representa a dispersão dos valores observados nos tratamentos com *Pa. chlamydospora*, o “Não tratado, com inoculação” revelou $\frac{1}{4}$ das observações com 0% de severidade, $\frac{1}{4}$ entre 0% e 16,7%, $\frac{1}{4}$ com 16,7%, e $\frac{1}{4}$ entre 16,7% e 33,3% de severidade. Verifica-se que os tratamentos BAS 516 CA F e o BAS 516 BZ F foram os únicos com distribuição semelhante ao “Não tratado, com inoculação”. Nestes, $\frac{1}{4}$ das observações obtiveram valores de severidade próximos de 0%. O segundo quartil revelou valores entre 0 e 8% para o BAS 516 CA F e entre 0 e 16,7% para o BAS 516 BZ F. O terceiro quartil compreendeu-se entre 8% e 25%, e entre 17% e 25%, respetivamente. O último quartil foi o de maiores diferenças entre tratamentos com valores compreendidos entre 25% e 50%, e entre 25% e 41,7%, respetivamente.

O tratamento BAS 516 CG F também revelou elevada dispersão de valores em que $\frac{1}{2}$ das observações obtiveram 0% de severidade, $\frac{1}{4}$ compreendeu-se entre 0 e 16,7%, estando o último quartil entre os 16,7% e os 41,7% com uma observação atípica nos 50%.

Os restantes tratamentos não revelaram dispersão de dados tão acentuada, particularmente no caso do BAS 516 BX F com a quase totalidade das observações apresentando severidade próxima de 0% sendo os sete “outliers” as restantes observações com valores de 8,3%. Apesar de o Software R considerar estas observações como “observações atípicas”, devido ao facto de serem várias, é improvável que sejam dados irreais, logo não se considerou estas como tal incluindo-as na análise estatística sem as “observações atípicas”.

Os tratamentos difenoconazol, BAS 516 CF F, BAS 516 AJ F e BAS 516 BY F apresentaram uma dispersão de tal forma que o primeiro e segundo quartis se caracterizavam por 0% de severidade, o terceiro quartil compreendeu-se entre os 0 e 8,3% e o último quartil entre os 8,3 e os 16,7%, excepto para o difenoconazol que se caracterizou por 8,3% de severidade. Contudo, estes tratamentos apresentaram observações atípicas. Houve duas no tratamento com difenoconazol nos 25%, uma no BAS 516 CF F e no BAS 516 AJ F nos 33,3%. As quatro “observações atípicas” do BAS 516 BY F foram uma nos 25%, duas no 33,3%, e uma no 41,7%. No BAS 516 CG F houve uma nos 50%.

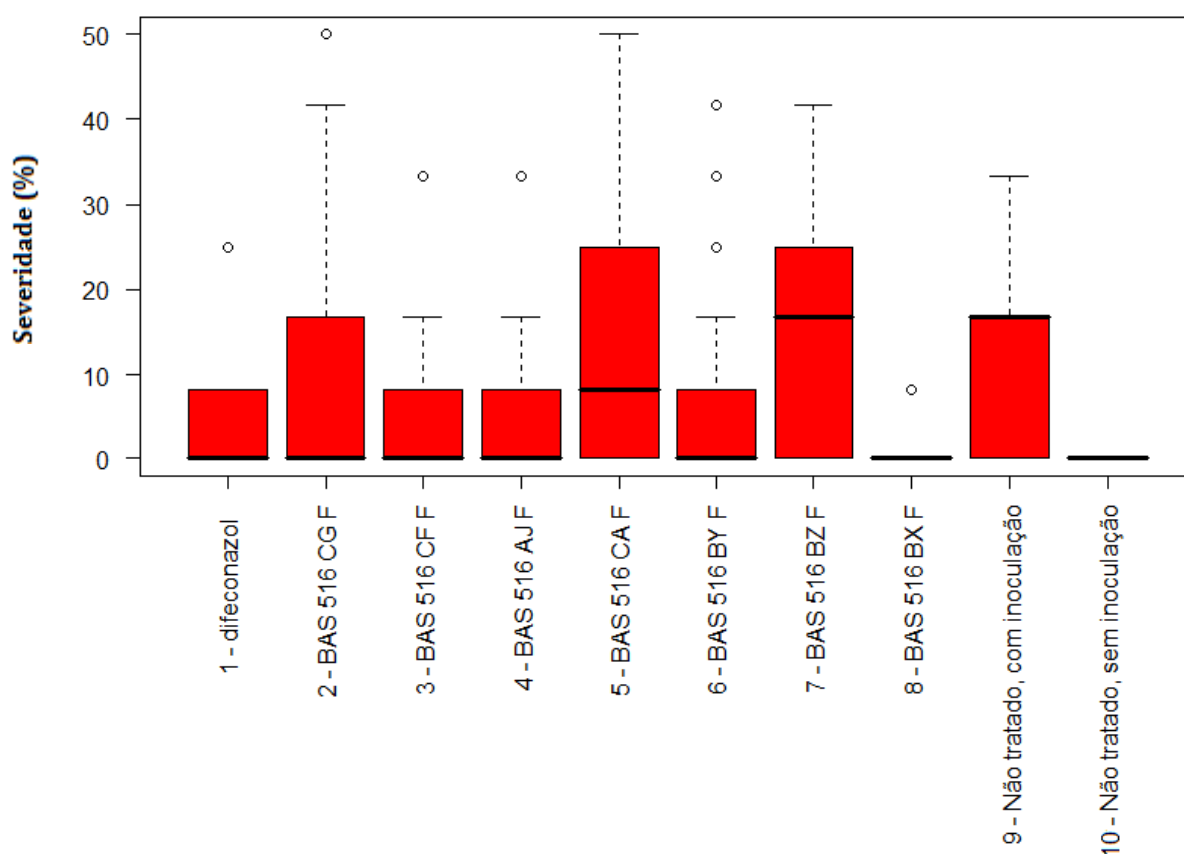


Fig. 5.15 - Caixa-de-bigodes demonstrando a dispersão dos valores de severidade causada por *Pa. chlamydospora* pelas 30 repetições de cada tratamento do Ensaio 2.

No caso da Fig. 5.16, relativo aos dados de incidência, o número de diferenças foi menos acentuado. O único tratamento que diferiu significativamente do “Não tratado, com inoculação” foi o BAS 516 BX F (36,7% e p-value “0,02”). Os tratamentos BAS 516 AJ F (46,7%) e BAS 516 CF F (73,3%) não apresentaram diferenças significativas relativamente ao “Não tratado, com inoculação”, contudo, o valor bastante baixo do p-value “0,08” sugere que a rejeição da não existência de diferenças foi devida ao erro resultante das comparações múltiplas. O par BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F também parece ser um exemplo disto, tanto graficamente como pelo baixo p-value “0,16”. Consultar no Anexo B, o Quadro 8.14 para informação mais detalhada sobre a análise utilizada.

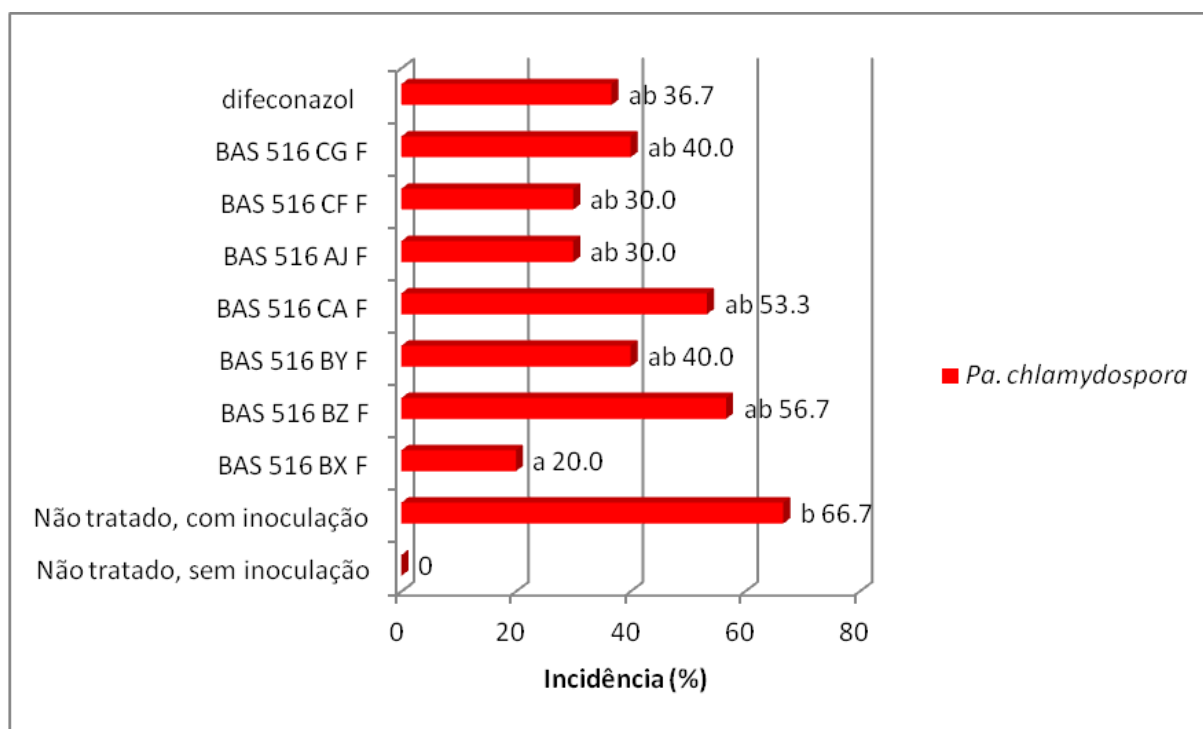


Fig. 5.16 - Incidência da doença causada por *Pa. chlamydospora* após os vários tratamentos em Arruda dos Vinhos. Letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

No Quadro 5.5 e no Quadro 5.6 é possível ver discriminados os valores de severidade, em %, dos reisolamentos efetuados por nível de isolamento do material proveniente de Arruda dos Vinhos. O primeiro dos quadros provém dos dados completos como foram obtidos do campo, no segundo foram removidas as “observações atípicas” identificados nas caixas-de-bigodes da Fig. 5.12 e Fig. 5.15, com exceção dos do tratamento BAS 516 BX F, que não se consideraram serem “observações atípicas”. No “Não tratado, sem inoculação” não foram efetuados isolamentos de nenhum dos fungos, comprovando-se a validade do ensaio.

Quando comparados ambos os quadros, no respeito aos reisolamentos de *N. parvum*, no “Não tratado, com inoculação” houve um incremento em % nos níveis 1, 2 e 3 de 92,5, 79,2 e 65,0, para 99,1, 84,8 e 69,6, respetivamente. No BAS 516 BY F um decréscimo de 37,5, 22,5 e 17,5 para 27,9, 10,6 e 4,8, respetivamente. No BAS 516 CG F houve um decréscimo de 32,5, 25,0 e 15,0 para 25, 16,7 e 5,5 e no difenoconazol, que também apresentou decréscimos, estes foram de 10,8, 3,3 e 0,0 para 7,1, 1,8 e 0,0, nos

níveis 1, 2 e 3, mais uma vez. Em média, os tratamentos decresceram de 51,3, 40,6 e 30,1 para 49,7, 38,8, 28,8, respetivamente.

Em relação aos reisolamentos de *Pa. chlamydospora*, quando comparados os quadros, verificaram-se novamente decréscimos em vários tratamentos, ou seja, a remoção dos valores de severidade das repetições onde se identificaram “observações atípicas” resultou numa distribuição de severidade nos vários níveis de cada tratamento ligeiramente diferente. Por exemplo, no tratamento BAS 516 BY F notou-se, desta vez, decréscimo de percentagens de severidade nos níveis 1, 2 e 3 de 14,2, 7,5 e 0,0 para 7,4, 4,6 e 0,0, respetivamente. No tratamento BAS 516 AJ F o decréscimo foi de 9,2, 2,5 e 0,0 para 6,8, 1,7 e 0,0, respetivamente. No tratamento BAS 516 CF F a diferença foi nos níveis 1 e 2 com um decréscimo de 8,3 e 2,5 para 7,8 e 0,0, sendo que no nível 3 houve 0,0% de severidade nos dois quadros. No BAS 516 CG F houve decréscimos nos três níveis de 13,3, 10,0 e 1,7 para 12,1, 8,6 e 0,0. Por último, no difenoconazol, que também apresentou decréscimo, este foi nos níveis 1 e 2 de 10,8 e 1,7 para 8,0 e 0,0, sendo que no nível 1 o reisolamento foi de 0% com ou sem “observações atípicas”. Em média, a remoção das “observações atípicas” resultou num decréscimo de 15,2, 7,2 e 0,3 para 13,7, 6,2 e 0,1.

O reisolamento foi decrescente desde o Nível 1 ao Nível 3 de isolamento. Isto foi, provavelmente, devido ao facto de ser nesta região das varas que se iniciou a secagem e morte da madeira.

Quadro 5.5 - Reisolamento (%) de *N. parvum* e *Pa. chlamydospora* por nível do talão nas videiras de Arruda dos vinhos.

Tratamento	Reisolamento de <i>N. parvum</i> (%) no Ensaio 2			Reisolamento de <i>Pa. chlamydospora</i> (%) no Ensaio 2		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Não tratado, sem inoculação	0	0	0	0	0	0
Não tratado, com inoculação	92,5	79,2	65,0	24,2	14,2	0,0
BAS 516 BX F	33,3	28,3	3,3	5,8	0,0	0,0
BAS 516 BZ F	81,7	68,3	61,7	23,3	14,2	0,0
BAS 516 BY F	37,5	22,5	17,5	14,2	7,5	0,0
BAS 516 CA F	76,7	66,7	57,5	27,5	12,5	0,8
BAS 516 AJ F	39,2	34,2	19,2	9,2	2,5	0,0
BAS 516 CF F	57,5	37,5	31,7	8,3	2,5	0,0
BAS 516 CG F	32,5	25,0	15,0	13,3	10,0	1,7
difenoconazol (Score®)	10,8	3,3	0,0	10,8	1,7	0,0
Média	51,3	40,6	30,1	15,2	7,2	0,3

Quadro 5.6 - Reisolamento (%) de *N. parvum* e *Pa. chlamydospora* por nível do talão nas videiras de Arruda dos vinhos, removendo as “observações atípicas”. A colorido estão demarcadas as observações que sofreram alteração devido a este facto.

Tratamento	Reisolamento de <i>N. parvum</i> (%) no Ensaio 2			Reisolamento de <i>Pa. chlamydospora</i> (%) no Ensaio 2		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Não tratado, sem inoculação	0	0	0	0	0	0
Não tratado, com inoculação	99,1	84,8	69,6	24,2	14,2	0,0
BAS 516 BX F	33,3	28,3	3,3	5,8	0,0	0,0
BAS 516 BZ F	81,7	68,3	61,7	23,3	14,2	0,0
BAS 516 BY F	27,9	10,6	4,8	7,4	4,6	0,0
BAS 516 CA F	76,7	66,7	57,5	27,5	12,5	0,8
BAS 516 AJ F	39,2	34,2	19,2	6,8	1,7	0,0
BAS 516 CF F	57,5	37,5	31,7	7,8	0,0	0,0
BAS 516 CG F	25,0	16,7	5,5	12,1	8,6	0,0
difenoconazol (Score®)	7,1	1,8	0,0	8,0	0,0	0,0
Média	49,7	38,8	28,1	13,7	6,2	0,1

6. Conclusões

O conhecimento sobre as doenças do lenho da videira evoluiu consideravelmente nos últimos anos. Isto foi referido neste trabalho particularmente no que diz respeito aos fungos Botryosphaeriaceae, cujo estudo tem sido alvo de confusão devido à existência de várias sinonímias para o mesmo fungo ou mesmo identificação errónea. Contudo, vários autores, incluindo Úrbez-Torres (2011), Slippers *et al.* (2013), Phillips *et al.* (2013) e Crous *et al.* (2006), têm trabalhado no sentido de esclarecer o estatuto dos fungos com recurso a técnicas biomoleculares e morfológicas. Apesar de se ter chegado a certo acordo entre investigadores, a evolução no uso de técnicas biomoleculares também conduziu à correta identificação de fungos previamente considerados como sendo uma determinada espécie, tal como, referido no trabalho, o caso de *N. parvum* que em vários estudos se pensava ser *B. dothidea* e só posteriormente se veio a identificar corretamente.

A existência de vários fungos causadores de doenças do lenho e a sua ocorrência em simultâneo numa mesma planta torna difícil a associação entre estes e os sintomas observados, dificultando o seu diagnóstico e implementação de apropriadas medidas de controlo, que podem variar consoante o fungo.

Qualquer estratégia de proteção integrada da vinha minimamente razoável passa primeiro por medidas de prevenção através, nomeadamente, da utilização de material de propagação inicialmente são, devido à ineficiência das medidas curativas. Para videiras já estabelecidas, concluiu-se que a proteção de feridas de poda, através da aplicação de fungicidas, constitui uma das estratégias mais importantes para o efeito.

Ainda assim, o elevado número de espécies torna difícil chegar ao consenso sobre qual o mais eficiente para o controlo determinada espécie e, mais relevante ainda, qual a substância com maior espectro de ação. E as dificuldades não terminam aí, pois, das várias substâncias estudadas por outros autores com melhores resultados na inibição do crescimento tanto de *Phaeomoniella chlamydospora* como de fungos de Botryosphaeriaceae, verificou-se que nem todas se encontram aprovadas para uso na União Europeia ou em Portugal, segundo a base de dados de pesticidas da Comissão Europeia. Isto deve-se a várias consequências negativas a nível ambiental ou mesmo de saúde pública decorrentes da aplicação destes.

Com estas limitações, torna-se constante a necessidade de estudo de novas substâncias passíveis de serem usadas no controlo destas doenças. Do objetivo deste trabalho, que foi fundamentalmente o estudo de eficácia de vários fungicidas no controlo de *Neofusicoccum parvum* e *Phaeomoniella chlamydospora*, várias conclusões podem ser retiradas.

No Ensaio 1, apesar de não terem sido capazes de reduzir o fungo na totalidade das repetições, ambos os fungicidas Tri-Wall e Esquive foram capazes de considerável redução na severidade da contaminação por *Neofusicoccum parvum* demonstrando a sua eficácia. Ainda que estatisticamente não tenha sido discriminado, o Tri-Wall pareceu ser ligeiramente mais eficaz não só reduzindo a severidade como a própria incidência do fungo para valores inferiores aos do Esquive. Relativamente à influência no comprimento das necroses, em termos médios, não parece ter havido grande diferença entre os vários tratamentos de cada ensaio, contudo a informação dada pelos gráficos de distribuição (caixas-de-bigodes)

parece contrapor, de certa forma, esta observação principalmente no caso dos tratamentos com Tri-Wall, indicando, de facto, uma diminuição no comprimento, observável em pelo menos metade das observações. Futuras repetições deveriam ser efetuadas no sentido de confirmar se realmente estes fungicidas possuem efeito significativo na redução do comprimento das necroses.

Ainda no Ensaio 1, concluiu-se que ambos os fungicidas Tri-Wall e Esquive foram eficazes no controlo de *Pa. chlamydospora* no que diz que respeito à diminuição da severidade e incidência da doença. É, mais uma vez, difícil concluir sobre qual o mais eficaz entre os dois fungicidas usados. Em termos da influência destes fungicidas no comprimento das necroses causadas por *Pa. chlamydospora*, concluiu-se que ambos os fungicidas desempenharam um papel importante na sua redução, contudo, o Tri-Wall foi o mais eficaz. De qualquer forma, estes resultados carecem de futuros ensaios de confirmação, dada a certa ambiguidade nos resultados obtidos.

Os reisolamentos *N. parvum* pareceram demonstrar certa correlação com os comprimentos de necrose observados no caso do Tri-Wall, ou seja, menores comprimentos e menores percentagens de reisolamentos. O mesmo não pode ser dito no caso do Esquive, na medida em que se verificaram menores níveis de reisolamentos comparativamente aos comprimentos de necroses que se apresentaram comparáveis aos da modalidade “Não tratado, com inoculação”.

No Ensaio 2, para controlo da severidade da doença causada por *N. parvum* as modalidades de tratamento mais eficazes foram o difenoconazol (Score®), o BAS 516 AJ F, o BAS 516 BX F, o BAS 516 BY F, o BAS 516 CG F e, não dispensando de comprovação futura por ter sido o menos eficaz, o BAS 516 CF F. Em termos de redução na incidência da doença, os tratamentos mais eficazes foram o BAS 516 AJ F, o BAS 516 BX F e o difenoconazol. As modalidades BAS 516 BY F e BAS 516 CG F foram menos eficazes, mas consideraram-se na mesma significativas para o efeito, alegações estas que não dispensam de futura comprovação.

As modalidades de tratamento mais eficazes no controlo da severidade de *Pa. chlamydospora* foram o BAS 516 BX F, o BAS 516 CF F e o BAS 516 AJ F. Quanto às modalidades de tratamento BAS 516 BY F e difenoconazol, concluiu-se que também apresentaram resultados interessantes no controlo da severidade da doença, contudo, carece-se de futuros ensaios para confirmar estas alegações. No caso da redução da incidência da doença, tal como no caso da severidade, uma vez mais o BAS 516 BX F mostrou-se o mais eficaz. Quanto à eficácia do BAS 516 CF F e do BAS 516 AJ F, repetições do ensaio seriam necessárias para confirmar, ainda assim, estes tratamentos foram alegadamente eficazes de forma significativa na redução da incidência. As mesmas afirmações não podem ser feitas no caso do BAS 516 BY F e difenoconazol com confiança.

Como referido anteriormente, o reisolamento destes fungos por nível de isolamento caracterizou-se por uma diminuição gradual na percentagem de reisolamentos do Nível 1 para o Nível 3 e a eliminação das observações atípicas revelou-se um fator essencial no detetar de diferenças importantes entre os tratamentos.

Como nota final a modalidade com resultados mais interessantes para o controle de ambos os fungos foi o BAS 516 BX F. Ainda assim, futuros ensaios de campo no sentido de avaliar as diferentes substâncias sob a influência das variáveis que inevitavelmente ocorrem seriam interessantes para eleger com maior grau de confiança a modalidade com maior potencial.

7. Referências bibliográficas

- Aboim-Ingles, M., Amaro, P. & Freitas, J., 2004. Esca: In *Manual Técnico de Proteção Integrada da Vinha na Região Norte*. P. Amaro (ed.). Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e Pescas. 2ª ed., 84-87.
- Abreo, E., Sebastián, M., Lina, B. e Sandra, L., 2011. *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevines from Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (Supplement), S77–S85.
- Adalat, K., Whiting, C., Rooney, S., Gubler, W.D., 2000. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 92-99.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A. e Bessis, R., 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1689–1701.
- Agustí-Brisach, C., & Armengol, J., 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(2), 245.
- Aït Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., Vernet, G, 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L: against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports* 22, 608-614.
- Akgul, D. S., Savas, N. G., Savas, Eskalen,, A., 2014. First Report of Wood Canker Caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on Grapevine in Turkey. *Plant Disease*, 98, 4, p. 568.1 - 568.1
- Alfredsen, G., Eikens, M., Miltz, H., Solheim, H., 2004. Screening of chitosan against wood deteriorating fungi. *Scandinavian Journal of Forest Research* 19 (Suppl.5), 4-13.
- Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S. & Monschetti, G., 2009. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 155–158.
- Alves, F. e Almeida, F., 2010. Declínio de videiras jovens - Breves apontamentos. Associação para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense • “Cluster” dos Vinhos da Região do Douro. *Boletim Informativo* 01-10 Sítio: <http://www.advid.pt/imagens/boletins/13470141161992.pdf>
- Amalfitano, C., Evidente A., Surico, G., Tegli, S., Bertelli, E. e Mugnai, L., 2000. Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 178–183.
- Amponsah, N.T., Jones, E.E., Ridgway, H.J. & Jaspers, M.V., 2009a. Rainwater dispersal of *Botryosphaeria* conidia from infected grapevine. *New Zealand Plant Protection* 62, 228–233.
- Amponsah, N.T., Jones, E.E., Ridgway, H.J. & Jaspers, M.V., 2011. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *Plant Pathology* 131(3):467-482.

Amponsah, N.T., Jones, E., Ridgway, H.J., & Jaspers, M.V., 2012. Evaluation of fungicides for the management of botryosphaeria dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science* 68, 676–83.

Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R., 2010. Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126, 165–174.

Baloyi, M., A., Halleen, F., Mostert, L. Eskalen, A., 2016. First Report of *Phaeomoniella chlamydospora* Pycnidia as Petri Disease Inoculum Sources in South African Vineyards. *Plant Disease* 100 (12), 2528.

Barbosa, A.M., Steluti, R.M., Dekker, R.F.H., Cardoso, M.S. e Corradi da Silva, M.L., 2003. Structural characterization of *Botryosphaeria*: a (1->3;1->6)- β -D-glucan produced by the ascomycetous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research* 338, 1691–1698.

Barr, M.E., 1972. Preliminary studies on the Dothideales in temperate North America. *Contributions to the University of Michigan Herbarium* 9, 523–638.

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22, 1087-1092.

Bell, A., Hubbard, J.C., Liu, L., 1998. Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium yellows of celery. *Plant Disease* 82, 322-328.

Bertelli, E., Mugnai, L., Surico, G., 1998. Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevines cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* 37, 79-82.

Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., Fontaine, F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62; 243-265

Bester, W., 2006. Characterisation and management of trunk disease-causing pathogens on table grapevines. *MSc Thesis, University of Stellenbosch*, 130 p.

Bester, W., Crous, P. W., e Fourie, P. H., 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology* 36, p. 73–77.

Bester, W., van Niekerk, J. M., Damm, U., Halleen, F., Crous, P.W., Fourie, P.H., 2006. Grapevine trunk disease pathogens: symptomatology and distribution in climatically diverse table grape growing regions of South Africa. In 'Proceedings of the 43rd Congress of the Southern African Society for Plant Pathology'. p. 39.

Bettiga, L. J., 2013. Grapevine Pest Management, Third Edition. University of California *Agriculture and Natural Resources* 3343.

- Bostock R.M. & Stermer, B. A., 1989. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 27, 343–371.
- Branas, J., 1967. Sur l'excoriose, sa cause et son traitement. *Le Progrès Agricole et Viticole* 82, 52–61.
- Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. & Sharnoff, S. 2001. Lichens of North America. Yale University Press, New Haven & London. 795 pp.
- Brown, E.A. & Britton, K.O., 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United States. *Plant Disease* 70, 480–484.
- Bruno, G., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sparapano, L., 2001. Biological activity of chitosan and its derivatives on plant pathogenic or antagonistic fungi and on host plants. In: *Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 17-20 September 2001, University of Évora, Portugal, 104-106.
- Bruno, G. & Sparapano, L., 2006. Effects on three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69, 182-194.
- Bugaret, Y., 1987. Comment lutter efficacement contre l'excoriose de la vigne. *Le Progrès Agricole et Viticole* 8, 121–126.
- Bush, E., 2009. Botryosphaeria canker and dieback of trees and shrubs in the landscape. *Virginia Cooperative Extension Report* 450-726.
- Calzarano, F. e Di Marco, S., 2007. Wood discoloration and decay in grapevines with esca proper and their relationship with foliar symptoms. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 96-101.
- Calzarano, F., D'agostino, V., Mugnai, L., Schiff, S., & Di Marco, S., 2014. Control of leaf stripe disease leaf symptoms by specific formulations for foliar nutrition." *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 543-558.
- Cardoso, M., Diniz, I., Cabral, A., Rego, C., & Oliveira, H., 2013. Unveiling inoculum sources of black foot pathogens in a commercial grapevine nursery. *Phytopathologia Mediterranea*, 52 (2), 298- 312.
- Carter, M.V., 1991. The status of *Eutypa lata* as a pathogen. *International Mycological Institute, Phytopathological Paper* No. 32.
- Castillo-Pando, M., A., Sommers, C.D. Green, M. Priest and M. Sriskanthades, 2001. Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasia Plant Pathology* 30, 59–63.
- Chamberlain, G.C., Willison, R.S., Townshed, J.L. e De Ronde, J.H., 1964. Two fungi associated with the dead-arm disease of grapes. *Canadian Journal of Botany* 42, 351–355.

Chen, W.Q., Morgan, D. P., Felts, D., Michailides, T.J. 2003. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachio. *Plant Disease* 87:359-365.

Chicau, G., Aboim-Inglez, M., Cabral, S. & Cabral, J. P. S., 2000. *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *Phaeoacremonium angustius* associated with esca and grapevine decline in Vinho Verde grapevines in northwest Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 80-86.

Chicau, G., 2006. Doença de Petri e pé negro da videira. Div. Doc. Inf. e Relações Públicas. Direção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho - Divisão de Proteção das Culturas.

Chollet, J. F., Couderchet, M., & Bonnemain, J. L., 2014. Crop protection: new strategies for sustainable development. *Environmental science and pollution research international*, 21(7), 4793.

Claus, P. 1965. "Dead-arm-disease" oder "Schwarzfleckenkrankheit", eine bisher wenig beachtete Pilzkrankheit im deutschen Wainsbau. *Dte Weinb* 20, 1291-1924.

Cobos, R., Mateos, R. M., Álvarez-Pérez, J. M., Olego, M. A., Sevillano, S., González-García, S., & Coque, J.J.R., 2015. Effectiveness of Natural Antifungal Compounds in Controlling Infection by Grapevine Trunk Disease Pathogens through Pruning Wounds. *Applied and environmental microbiology*, 81(18), 6474-6483.

Copes, W.E., e Hendrix, F.F.Jr., 2004. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa*, and *B. rhodina*. *Plant Disease* 88, 292–296.

Corradi da Silva, M.L., Izeli, N.L., Martinez, P.F., Silva, I.R., Constantino, C.J.L., Cardoso, M.S., Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H. e da Silva, G.V.J., 2005. Purification and structural characterisation of (1->3;1->6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. *Carbohydrate Polymers* 61, 10–17.

Creaser, M.L. & Wicks, T.J., 2004. Short-term effects of remedial surgery to restore productivity to *Eutypa lata* infected vines. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 105–107.

Crocker, J., Waite, H., Wright, P., Fletcher, G., 2002. Source area management: avoiding cutting dehydration and good nursery management may be the key to successful hot water treatment. Australian and New Zealand Grapegrower Winemaker. *Annual Technical Issue* 461a, 33–37.

Crognale S., Federici, F. e Petruccioli, M., 2003. Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill waste waters. *Biotechnology Letters* 25, 2013–2015.

Crous, P. W., Gams, W., Wingfield, M. J., Van Wyk, P.S., 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia* 88, 786-796.

Crous, P.W. e Palm, M.E., 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 51, 167–175.

- Crous, P. W. & Gams, W., 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112-118.
- Crous, P.W., Kang, J.C., Braun, U., 2001. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93 : 1081–1101.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Del Rio, J.A., Gonzalez, A., Fuster, M.D., Biotia, J.M., Gomez, P., Fraix, V. & Ortuno, A., 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (Supplement), S394–S399.
- Del Rio, J.A., Gomez, P., Baidez, A., Fuster, M.D., Ortuno, A. & Fraix, V., 2004. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevines against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 87–94.
- Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J-C, Pascoe, I., Wingfield, M.J., 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45:129 – 140.
- Devore, J. L. e Berk, K. N., 2011. Modern Mathematical Statistics with Applications (Second Edition). *Springer Science & Business Media*, p. 845.
- Di Marco, S., Mazzulo, A., Calzarano, F., Cesari, A., 2000. The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 232-240.
- Di Marco, S., Osti, F. & Cesari, A., 2004. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 108–116.
- Di Marco S. e Osti, F., 2007. Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 73–83.
- Di Marco, S., & Osti, F., 2009. Activity of electrolyzed acid water for the control of *Phaeomoniella chlamydospora* in the nursery. *Phytopathologia. Mediterranea*, 48, 47-58.
- Dias, A. e Rego, C. 2013. Escoriose Europeia – artigo técnico. Syngenta. Publicação online: <http://www.syngenta.com/country/pt/pt/culturas/artigostecnicos/Pages/0001.aspx>
- Díaz, G. A. e Latorre, B. A. , 2014. Infection Caused by *Phaeomoniella chlamydospora* associated with esca-like symptoms in grapevine in Chile. *The American Phytopathological Society* volume 98, número 3, 351-360.

Dias, M.R. de S., 1980. *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., fungo responsavel pela “excoriose” da videira. Proceedings I Congresso Português de Fitiatria e Fitofarmacologia, Dezembro 11–19, 1980, Lisboa, Portugal, 175–192.

Dias, M. & Lucas, M., 1980. Fungi of Madeira and Selvagens Islands. *Bolletín da Sociedade Broteriana* 53, 469–476.

Djoukeng J.D., Polli, S., Larignon, P. e Abou-Mansour, E., 2009. Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 124, 303–308.

Doidge, E.M., Bottomley, A.M., van der Plank, J.E. e Pauer, G.D.C., 1953. A revised list of plant diseases in South Africa. *Science Bulletin*, Department of Agriculture, South Africa 346, 1–122.

Dubos, B. & Larignon, P., 1988. Esca and black measles: In: Compendium of grape diseases. *American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, 34–35.

Dubos, B. 1999. Maladies cryptogamiques de la vigne. *Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne*. Féret Eds., p.200.

Dupont, J., Laloui, W., Roquebert, M.F., 1998. Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. *Mycological Research* 102, 631–637.

Edwards, J., Marchi, G., Pascoe, I., 2001. Young esc in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S303–S310.

Edwards, J., Pascoe, I.G., 2004. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* 33, 273–9.

Edwards, J., Salib, S., Thomson, F., Pascoe, L., 2007a. The impact of *Phaeomoniella chlamydospora* infections on the grapevine’s physiological response to water stress Part 1: Zinfandel. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 26–37.

Edwards, J., Salib, S., Thomson, F., Pascoe, L., 2007b. The impact of *Phaeomoniella chlamydospora* infections on the grapevine’s physiological response to water stress Part 2: Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 38–49.

Edwards J., Pascoe, I.G. & Salib, S., 2007c. Impairment of grapevine xylem function by *Phaeomoniella chlamydospora* is due to more than physical blockage of vessels with ‘goo’. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 87–90.

Elena G., Di Bella, V., Armengol, J., & Luque, J., 2015. Viability of Botryosphaeriaceae species pathogenic to grapevine after hot water treatment. *Phytopathologia Mediterranea*, 54 (2), 325– 334.

Epstein L., Sukhwinder, K. & VanderGheynst, J.S., 2008. *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. *California Agriculture* 62, 161–166.

Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. Second edition. John Wiley, New York, USA, 1876 pp.

Eskalen, A. & Gubler, W.D., 2001. Association of spores of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* and *Pm. Aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S429-S432.

Eskalen, A., Gubler, W.D., Khan, A., 2001. Rootstock susceptibility to *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S433-S438.

Eskalen, A., Feliciano, A.J. & Gubler, W.A., 2007a. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease* 91, 1100-1104.

Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P. W., Groenewald, J.Z., Surico, G., 2008. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia* 21, 119-134.

Evidente A., Punzo, B., Andolfi, A., Cimmino, A., Melck, D. e Luque, J., 2010. Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 74–79.

Farr, D.F., Rossman, A.Y., 2011. *Fungal databases*, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved 13 Jul 2011. (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>)

Favaron, F., Lucchetta, M., Odorizzi, S., Pais da Cunha, A.T. & Sella, L., 2009. *The role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against Botrytis cinerea and of fungal laccase on the solubility of putative grape PR protein*. *Journal of Plant Pathology*, 91 (3), 579–588.

Feliciano, A.J., Eskalen, A. & Gubler, D.W., 2004. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 66–69.

Fischer M., 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S30–S42.

Fourie, P.H., Halleen, F., Vyver, J.V.D. & Schreuder, W., 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 40, 473–478.

Fourie, P.H., Halleen, F. 2002. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Australasian Plant Pathology* 33: 425-426.

Fourie, P.H., Halleen, F., 2004. Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 31:313-315.

Fourie, P.H. & Halleen, F., 2006. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116, 255–265.

Fragoeiro, S.I.S., 2001. Estudo bioquímico de videiras invitro infectadas com *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium angustius* e caracterização dos microrganismos envolvidos na doença. Dissertação de Mestrado em Toxicologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 126 pp.

Fremont, L., 2000. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences* 66: 663–673.

Fromard, L., Babin, V., Fleurat-Lessard, P., Fromont, J. C., Serrano, R., e Bonnemain, J. L., 1995. Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species (physiological and immunological studies). *Plant Physiology* 108, 913–918.

Fuente, M. de la, Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy Z. A., Borgo, M., Rego, C., Marie-France Corio-Costet M.-F., 2016. Grapevine Trunk Diseases. A review. ©OIV publications, 1st Edition, (Paris, France) págs 24.

Gaudineau, M., 1961. Esca, excoriose, antrachnose de la vigne. *Bulletin de l'Office International du Vin* 34, 21–32.

Gerbore, J., 2013. Lutte biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca de la vigne, par utilisation de l'oomycète *Pythium oligandrum*. Doctoral dissertation, Pau.270p.

Ghisalberti, E.L. e Sivasithamparam, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 1011–1020.

Giménez-Jaime A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. e Armengol, J., 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 154, 598–602.

Graham, A., 2007. Integration of hot water treatment with biocontrol treatments improves yield and sustainability in the nursery. *Australian and New Zealand Grapegrower Winemaker* 534,33–39.

Gramaje, D., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2008. Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments *in vitro*. *Annals of Applied Biology* 153, 95–103.

Gramaje, D., Armengol, J., Salazar, D., López-Cortés, I., García-Jiménez, J., 2009a. Effect of hotwater treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection* 28, 280-285.

Gramaje, D., García-Jiménez, J., & Armengol, J., 2010. Grapevine rootstock susceptibility to fungi associated with Petri disease and esca under field conditions. *Am. J. Enol. Viticult.*, 61,512-520.

- Gramaje, D., & Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95(9), 1040-1055.
- Gramaje, D., & Di Marco, S., 2015. Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 54 (2), 313–324.
- Gray, D., Zhijian T., L., & Dhekney, S., A., 2014. Precision breeding of grapevine (*Vitis vinifera* L.) for improved traits. *Plant Science*, 228, 3–10 .
- Guan, X., Essakhi, S., Laloue, H., Nick, P., Chong, J., & Bertsch, C., 2015. Mining new resources for grape resistance against Botryosphaeriaceae: a focus on *Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris*". *Workshop COST action FA1303*. Cognac (France). 28.
- Gubler F., Millar, A.A., Jacobsen, J.V., 2005. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr. Opin. Plant Biology*. 8: 183–187.
- Haleem, R. A., Abdullah, S. K., Jubrael, J. M. S., 2011. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria parva* associated with grapevine decline in Kurdistan region – Iraq. *Acta Agrobotânica* 65 (1); 71: 782012.
- Halleen, F., Crous P.W., Petrini, O., 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32, 47–52.
- Halleen, F., Fourie, P.H. 2005. Protection of grapevine pruning wounds against fungal infections. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 117.
- Halleen F., Fourie, P.H. e Lombard, P.J., 2010. Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31, 125–132.
- Harman, G.E, Howel, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & M. Lorito, 2004. *Trichoderma* - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews, Microbiology* 2, 43–56.
- Hewitt, W.B. & Pearson, R.C., 1988. *Phomopsis* cane and leaf spot. p. 17–18. In: *Compendium of Grape Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, 93 pp.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87, 4–10.
- Jaspers, M.V., 2001. Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of *Phaeoemoniella chlamydospora*. *Pathopathologia Mediterranea* 40, S453-S458.
- KeXiang, G., XiaoGuang, L., RunFang, G., BaoJian, G., TianBo, Z. 2002. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi. *Journal of Shandong Agricultural University* 33:42.
- Kummuang N., Diehl, S.V., Smith, B.J. e Graves, C.H.Jr., 1996. Muscadine grape berry rot in Mississippi: Disease epidemiology and crop protection. *Plant Disease* 80, 244–247.

- Kuntzmann P., Villaume, S. e Bertsch, C., 2009. Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 150–154.
- Larignon, P. & Dubos, B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147-157.
- Larignon, P. 1999. Black foot disease in France. In Black Goo: Symptoms and Occurrence of Grape Declines - IAS/ICGTD Proceedings 1998. L. Morton (eds.). *International Ampelography Society*, Fort Valley, Virginia, 89-90.
- Larignon, P. & Dubos, B., 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 84-89.
- Larignon, P., Lecomte, P. & Dubos, B., 2000. Comment évaluer l'importance des maladies du bois dans le vignoble? *Union Girondine* 956, 36–38.
- Larignon, P. & Dubos, B. 2001. The villainy of Black Dead Arm. *Wines & Vines* 82:86–89.
- Larignon, P., Fulchic, R., Laurent, C. e Dubos, B., 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S336–S342.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., & Clément, C., 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *C. R. Biologies*, 332, 765–783 .
- Latorre B.A., X. Besoain e V. Flores, 1986. *Botryosphaeria* canker of table grapes. *Phytopathology* 76, 1112.
- Latorre, B. A, Torres, R., Silva, T. & Elfar, K., 2013. Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. *Cienc. Inv. Agr.* [online]. vol.40, n.3, pp.547-557.
- Laukart, N., Edwards, J., Pascoe, I., Nguyen, N., 2001. Curative treatments trialed on young grapevine infected with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S459-S463.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., Guerin-dubrana, L., 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*. 48, 32-46.
- Leavitt, G.M., 1990. The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *vitis vinifera* in California, Arizona and Northern Mexico. Ph.D. dissertation, University of California, Riverside, CA, USA.
- Lecomte, P., Leyo, M., Louvet, G., Corio-Costet, M.F., Gaudillère, J.P. e Blancard, D., 2005. Le Black dead arm, genèse des symptoms. *Phytoma* 587, 29–37.
- Lecomte, P., Darrieutort, G., Defives, A., Louvet, G., Limanana, J.M., Blancard, D., 2006. Observations of black dead arm symptoms in Bordeaux vineyards: evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal

necroses, questions, hypotheses. *IOBCWPRS Bulletin 29, Working Group "Integrated Protection in Viticulture", Proceedings of a Meeting at Boario Terme (Italy), 20–22 October 2005*, 93–4.

Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J. M., & Comont, G., Murumendaraz, A., Legorburu, F.J., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Amil, R., & Fernaud, M. 2012. New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease*. 96: 924-934.

Lehoczký, J. 1974a. Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9: 319-327.

Lehoczký J., 1988. Black dead arm. p. 35. In: *Compendium of Grape Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, 93 pp.

Liu J-K, Phookamsak, R., Doilom, M., Wikee S, Li Y-M, 2012. Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. *Fungal Diversity* 57: 149–210.

Lombard, L., Van Der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W., 2014. Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 515-532.

Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma and Gliocladium*, Volume 2 (G.E. Harman, C.P. Kubicek, ed.), Taylor and Francis Limited, London, U.K., 73–99.

Lourenço, P. A. F., 2001. Doença de Petri: Caracterização de Isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* Obtidos de Materiais Vitícolas em Portugal. *Relatório de Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa*, 81pp.

Luque, J., Martos, S., Phillips, A.J.L. 2005. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97: 1111-1121.

Luque J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R. e Garcia- Fihueres, F., 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91, 381–390.

Luque, J., Elena, G., Garcia-Figueres, F., Reyes, J., Barrios, G., & Legorburu, F. J., 2014. Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 134–143.

MacKenzie, A.J., Ownley, B.H., Starman, T.W., Windham, M.T., 2000. Effect of delivery method and population size of *Trichoderma harzianum* on growth response of unrooted chrysanthemum cuttings. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 730-735.

Mailhac, N., Pouzoulet, J., Lummerizheim, M., & Violleau, F., 2010. Impact of ozonation on grapevine scion decontamination. *Phytopathologia Mediterranea*, 49,127-128.

Marchi, G., Roberti, S., D'ovidio, R., Mugnai, L. & Surico, G., 2001. Pectic enzymes production by *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (Supplement), S407–S416.

Martín, M. T., & Cobos, R., 2007. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 18–25.

Martin, N., Vesentini, D., Rego, C., Monteiro, S., Oliveira H., Boavida Ferreira R., 2009. *Phaeomoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 101-116.

Martos S., Andolfi, A., Luque, J., Mugnai, L., Surico, G. e Evidente, A., 2008. Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121, 451–461.

Milholland, T.J., 1988. *Macrophoma* Rot. p. 24. In: *Compendium of Grape Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, pp. 93

Mondello, V., Lo Piccolo, S., Conigliaro, G., Alfonzo, A., Torta, L. & Burrua, S., 2013. First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other Botryosphaeriaceae species associated with *Botryosphaeria* dieback of grapevine in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 52, 2, 388–396.

Morton, L., 2000. Viticulture and grapevine decline: Lessons of black goo. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 59-67.

Mostert L., Crous, P.W. e Petrini, O., 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the “*Phomopsis viticola*” complex. *Sydowia* 52, 46–58.

Mostert, L., Groenewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W., Crous, P.W., 2006. Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology* 54, 1-115.

Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G., 1999. Esca (Black Measles) and Brown Wood Streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404-418.

Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen F. & Mostert, L.. 2011a. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (Supplement), S264–S276

Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F. & Mostert, L.. 2011b. Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (Supplement), S46–S60.

Nascimento, T. Rego, C. e Oliveira, H., 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 218–224

OIV RESOLUTION VITI 2/2006. Measures used to prevent or limit the proliferation of wood diseases.

- O’Gorman, D.T., Haag, P. e Sholberg, P.L., 2010. First report of *Eutypa dieback* and other emerging grapevine diseases in the Okanagan Valley. *Canadian Plant Disease Survey* 90, 158–160
- Oliveira, H., Rego, C., Nascimento, T., 2004. Decline of young grapevine caused by fungi. *Acta Horticulturae* 652, 295-304.
- Oliveira, H., Rego, C., Teixeira Santos, M., Nascimento, T., Cabral, A. 2007. Declínio das videiras jovens: novos desenvolvimentos. In *Actas 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, Vol. 1, 25 de Maio, 75-85.
- Oliveira, H., Rego, C., Nascimento, T., Vaz, A.T., Cabral, A. 2008. “Black Dead Arm” da videira: uma doença, um complexo de doenças ou uma variante de esca? *Revista da APH* nº 92: 13-20.
- Osti, F. & Di Marco, S., 2010. Iron-dependent, non-enzymatic processes promoted by *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*, agents of esca in grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74, 309–316.
- Palmero, R. P., 2007. Enfermedades fúngicas de la madera en viña. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural Área de Águas y Agricultura, Cabildo Insular de Tenerife.. p. 16
- Pantidou, M.E. 1973. Fungus-host index for Greece. Benaki Phytopathological Institute, Kiphissia, Athens, Greece, p. 382
- Pearce, R.B. 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *The New Phytologist* 132, 203–233.
- Pennycook, S.R. & Samuels, G.J., 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24, 445–458.
- Pertot, I., Prodanutti, D., Colombini, A., Pasini, L., 2016. *Trichoderma atroviridae* SC1 prevents *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl* 61: 257.
- Phillips, A.J.L. e Lucas, M.T., 1997. The taxonomic status of *Macrophoma flaccida* & *Macrophoma reniformis* and their relationship to *Botryosphaeria dothidea*. *Sydowia* 49, 150–159.
- Phillips, A.J.L., 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoiiose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146, 327–332.
- Phillips, A.J.L., 2000b. Excoiiose, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 341–356.
- Phillips, A.J.L., 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3-18.

- Phillips, A.J.L., Fonseca, F., Pova, V., Castilho, R., Nolasco, G., 2002. A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia* 54: 59–77.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A., Crous, P.W., 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21: 29-55.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, Slippers J., B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., & Crous, P.W., 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies In Mycology* 76: 51–167.
- Pinto, R., Rodrigues, T., Nascimento, T., Rego, C., Oliveira, H., 2005. Microflora associada ao declínio de plantas-mãe de porta-enxertos de videira. *A Produção Integrada e a Qualidade e Segurança Alimentar*, Ed. IPC, Vol 1, 191-199.
- Pinto, P. S. 2010. Doença de Petri da Videira: Avaliação da eficácia de fungicidas na proteção de feridas de poda. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa, 64pp.
- Pitt W.M., Huang, R., Steel, C.C. e Savochia, S., 2010. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 16, 258–271.
- Pitt, W., Savocchia, S. e Wunderlich, N., 2012. *Botryosphaeria* dieback identification and management. *National Wine and Grape Industry Centre* pp.6
- Pitt, W. M. & Úrbez-Torres J. R. & Trouillas, F. P., 2013. *Dothiorella vidmadera*, a novel species from grapevines in Australia and notes on *Spencermartinsia*. *Fungal Diversity* 11p.
- Pollastro, S., Dongiovanni, C., Abbatecola, A., Faretra, F. 2000. Observations on the fungi associated with esca and on spatial distribution of esca symptomatic plants in Apulian (Italy) vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 39:206–210
- Pouzoulet, J., & Rolshausen, P.,E. 2014. Anatomical differences of grapevine xylem influences tolerance to esca disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 575.
- Quaglia, M., Covarelli, L., & Zizzerini, A., 2009. Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 48,84-91.
- Ravaz L. e G. Verge, 1925. Sur une maladie de la vigne, l'excoriose. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, France*, 180, 313–315.
- Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., Phillips, A., 2000. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 26-34.

Rego, C., A. Carvalho, T. Nascimento e H. Oliveira, 2001. First approach on the understanding of inoculum sources of *Cylindrocarpon destructans* and *Phaeomoniella chlamydospora* concerning grapevine rootstocks in Portugal. IOBC/ wprs Bulletin 24, 67-72.

Rego, C., 2004. Estudo e caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) responsáveis pelo pé-negro da videira em Portugal. Dissertação apresentada ao Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida” – Instituto Superior de Agronomia, para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, ISA/LPVVA, UTL, Lisboa, 228 pp.

Rego, C. Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A. e Oliveira, H., 2006. Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 45:S93-S100.

Rego, C., Oliveira, H., Böhm, H. J., Lehmann, J., Zapater, J. M. M., Rubio, R. O., Miguel, V. G., 2011. *Atlas das castas da Península Ibérica*. Dinalivro, Lisboa 320.

Rego, C., Reis, P., Dias, A., & Correia, R., 2014. Field evaluation of fungicides against *Botryosphaeria* canker and *Phomopsis* cane and leaf spot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 581-582.

Retief, E., Damm, U., van Niekerk, J.M., McLeod, A., Fourie, P.H., 2005. A protocol for molecular detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine wood. *South African Journal of Science* 101, 139-142.

Ridgway, H.J., Sleight, B.E., Stewart, A. 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand vineyards and its detection in grapevine wood using species specific PCR. *Australas. Plant Pathology*, 31:267-271

Rioux D. e Quéllette, G.B., 1989. Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various non-host trees and shrubs. *Canadian Journal of Botany* 67, 2335-2351.

Rioux, D., Chamberland, H., Simard, M., Ouellette, G.B., 1995. Suberized tyloses in trees: an ultrastructural and cytochemical study. *Planta*, 196: 125-140.

Rolshausen, P.E. e Gubler, W.D., 2005. Use of boron for the control of *Eutypa* dieback of grapevines. *Plant Disease* 89, 734-738.

Rolshausen, P.E., Greve, L.C., Labavitch, J.M., Mahoney, N.E., Molyneux, R.J. & Gubler, W.D., 2008. Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: Identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology* 98, 222-229.

Rolshausen, P.E. e Wilcox, W., 2009. Identifying the causes of wood cankers and branch dieback in eastern U. S. vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 164.

Rolshausen, P. E., Úrbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J., e Gubler, W. D. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *Am. J. Enol. Viticult.* 61:113-119.

Santos, C., Fragoeiro, S., Oliveira, H., Phillips, A., 2006. Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. *Scientia Horticulturae* 107, 131-136.

Sathiyabama, M. e Balasubramanian, 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Protection* 17, 307-313.

Savocchia S., Laurent, E.N., Stodart, B.J. e Steel, C.C., 2005. Botryosphaeria canker and sensitivity to fungicides *in vitro*. In: *Proceedings of the 43rd Annual Congress of the South African Society for Plant Pathology*. January 23–26, 2005, Hartenbos, South Africa, 88 (abstract).

Scheck, H.J., Vasquez, S., Gubler, W.D., 1998. First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease* 82, 590.

Selbmann L., Stringele, F. e Petruccioli, M., 2003. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 135–145.

Sentenac, G., Larignon, P., Molot, B., Viguès, V., & Kuntzmann, P., 2004. Evaluation de l'efficacité de fongicides et d'agents biologiques utilisés dans la lutte contre les maladies du bois Esca et BDA. *Premiers résultats d'expérimentations menées sur le terrain*. *Les Maladies du Bois en Midi-Pyrénées*. 28-31.

Serra, S., Mannoni, M.A. & Lígios, V., 2008. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 47, 234-246.

Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83-101.

Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A.J.L., Groenewald, J.Z., Wingfield, M.J., 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: A systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76: 31–49.

Smart, R., 2015. Trunk diseases: Timely trunk renewal to overcome trunk disease. *Wine & Viticulture Journal*, 30(5), 44.

Smith, H., Kemp, G.H.J., Wingfield, M.J., 1994. Canker and dieback of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* 43, 1031–1034.

Sosnowski, M.R., Creaser, M.L., Wicks, T.J., Lardner, R. e Scott, E.S., 2008. Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14, 134–142.

Sosnowski, M. R., Loschiavo, A., Wicks, T., e Scott, E. 2010. Sustaining grapevines infected with *Eutypa* dieback. *SAR06/01 Final report to the Grape and Wine Research and Development Corporation*. pp.57. Publicação Online:

http://www.sardi.sa.gov.au/_data/assets/pdf_file/0004/133897/GWRDC_Final_Report_SAR_06_01.pdf

- Sosnowski M.R., Wicks, T. W. and Scott, E. S. 2010b. Controlling Eutypa dieback by remedial surgery. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 125 (abstract).
- Spagnolo A., Marchi, G., Peduto, F., Phillips, A.J.L. e Surico, G., 2011. Detection of Botryosphaeriaceae species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *European Journal of Plant Pathology* 129, 485–500.
- Sun, Q., Rost, T. L., Mathews, M. A., 2008. Wound-induced vascular occlusions in *Vitis vinifera* (Vitaceae): Tyloses in summer and gels in winter. *American Journal of Botany*, vol. 95, no. 12, 1498-1505.
- Surico, G., Mugnai, L. e Marchi, G., 2006. Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S68–S86.
- Surico, G., Mugnai, L. e Marchi, G., 2008. The Esca disease complex. *Integrated Management of Disease Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria* (A. Ciancio, K.G. Mukerji, ed.), Springer, Heidelberg, Germany, 119–136.
- Taylor, A., Hardy, G.E.St J., Wood, P. e Burguess, T., 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34, 187–195.
- Thate, R. 1965. Die Schwarzfleckenkrankheit (dead arm disease) der Rebe, eine für Deutschland neue Pilzkrankheit. *Weinberg und Keller* 12, 505–519.
- Tomaz, I.L. e Rego, C.N.F., 1990. Fungos do complexo responsável pelo declínio das videiras em Portugal. *Vida Rural* 1493, 12–20.
- Torr, K.M., Chittenden, C., Franich, R.A., Kreber, B., 2005. Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood-inhabiting fungi. *Holzforschung* 59, 559-567.
- Travadon, R., Rolshaussen, P. E. Gubler, W.D., Cadle-Davidson, L., e Baumgartner, K. 2013. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease*, 97:1529-1536.
- Travadon, R., Preece, J.E., & Baumgartner, K., 2014. Evaluating grapevine germplasm for resistance to Eutypa dieback. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 578-579.
- Travadon, R., Lawrence, D.,P., Rooney-Latham, S., Gubler, W.,D., Wilcox, W.F., Rolshausen, P. E., & Baumgartner, K., 2015. Cadophora species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal biology* 119, 53-66 .
- Troccoli, L., Calamassi, R., Mori, B., Mugnai, L. e Surico, G., 2001. *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction, histological reactions to fungal infection. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (Supplement), S400–S406.

- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M. e Gubler, W.D., 2006a. Identification and distribution of *Botryosphaeria* species associated with grapevines cankers in California. *Plant Disease* 90, 1490–1503.
- Úrbez-Torres J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J., Striegler, K., Allen, A. e Gubler, W.D., 2007b. Identification of fungal pathogens associated with grapevine cankers in the main grape-growing areas of the United States and Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 109–110.
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J. e Gubler, W.D., 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* e *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92, 519–529.
- Úrbez-Torres, J.R., Adams, P., Kamas, J. e Gubler, W.D., 2009. Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 497–507.
- Úrbez-Torres J.R. e Gubler, W.D., 2009b. Double pruning, a potential method to control Bot canker disease of grapes, and susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by Botryosphaeriaceae. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 185.
- Úrbez-Torres, J.R. Battany, M., Bettiga, L.J., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R.J., Verdegaal, P. e Gubler, W.D., 2010a. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease* 94, 717–724.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Rooney-Latham, S., Gubler, W. D., 2010b. First Report of *Diplodia corticola* Causing Grapevine (*Vitis vinifera*) Cankers and Trunk Cankers and Dieback of Canyon Live Oak (*Quercus chrysolepis*) in California. *Plant Disease* 94, 6 p. 785
- Úrbez-Torres J.R., Peduto, F. e Gubler, W.D., 2010c. First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassisporea* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Disease* 94, 785.
- Úrbez-Torres, J., 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* (2011) 50 (Supplement), S5–S45
- Úrbez-Torres, J.R. e Gubler, W.D., 2011. Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* e *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology* 60, 261–270.
- Úrbez-Torres, J., O’Gorman, D., Haag, P. 2011. Grapevine trunk diseases. Pacific Agriculture Research Centre, Summerland BC. Sítio Online: http://www.brocku.ca/webfm_send/16928
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Striegler, K., Rupe, J.C., Cartwright, R.D. e Gubler, W. D., 2011. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity*, doi:10.1007/s13225-011-0110-4.

- Úrbez-Torres, J.R., Haag, P., Bowen, P., Lowery, T., & O’Gorman, D., 2015. Development of a DNA Macroarray for the Detection and Identification of Fungal Pathogens Causing Decline of Young Grapevines. *Phytopathology*, 105, 1373-1388.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G. e Fleurat-Lessard, P., 2009. Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology* 91, 37–51.
- van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Fourie, P.H. & Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.
- van Niekerk, J., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F. e Crous, P. W., 2005. *Phomopsis* spp. on grapevines: Characterisation and pathogenicity. In: *4th Interna Workshop on Grapevine Trunk Diseases (IWGTD)*, Stellenbosh, Stellenbosch, South Africa. pp. 30
- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F., e Crous, P. W. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45:S43-S54.
- van Niekerk J.M., Calitz, F.J., Halleen, F. & Fourie, P., 2010a. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 127, 375–390.
- Vasquez, S.J., Gubler, W.D., Leavitt, G.M., 2007. Economics in California’s table grape vineyards due to measles. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 118.
- Vaz, A. T., 2008. Doenças causadas por fungos Botryosphaeriaceae em videira: Caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa, pp. 64
- Venkatasubbaiah, P. e Chilton, W., 1990. Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa*. *Journal of Natural Products* 53, 1628–1630.
- Venkatasubbaiah P., Sutton, T.B. e Chilton, W.S., 1991. Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and froeye leaf spot. *Phytopathology* 81, 243–247.
- Vigues, V., Yobregat, O., Barthélémy, B., Dias, F., Coarer, M., & Larignon, P., 2009. Fungi associated with wood decay diseases: Identification of the steps involving risk in French nursery. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 177-178.
- Vigues, V., Yobregat, O., Barthélémy, B., Dias, F., Coarer, M., Girardon, K., Berud, F., Muller, M., & P. Larignon, 2010. Wood decay diseases: tests of disinfection methods in French nursery. *Phytopathologia Mediterranea*, 49,130-131.
- Waite, H. e Morton, L., 2007. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 5-17.

Weber E.A., Trouillas, F.P. e Gubler, W.D., 2007. Double pruning of grapevines: a cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 61–66.

Weiner, G. e Liese, W., 1995. Wound response in the stem of the royal palm. *International Association of Wood Anatomists Journal* 16, 422–433.

Wells, J.M. e Boddy, L., 1995. Effect of temperature on wood decay and translocation of soil-derived phosphorus in mycelial cord systems. *New Phytologist* 129, 289–297

Whiteman, S.A., Jaspers, M.V., Stewart, A., Ridgway, H.J., 2003. Identification of potential sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in the grapevine propagation process. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 152 (abstract).

Witcher, W. & Clayton, C.N., 1963. Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea* (*B. ribis*). *Phytopathology* 42, 521–525.

Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M. e Lorito, M., 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathology* 96, 181–184.

Woo, S.L. e Lorito, M., 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for bio-control. *Novel Biotechnologies for Bio-control Agent Enhancement and Management* (M. Vurro, J. Gressel, ed.), Springer Press, Amsterdam, The Netherlands, 107–130.

Wood P.M. & Wood, C.E., 2005. Cane dieback of dawn seedless table grapevines (*Vitis vinifera*) in Western Australia caused by *Botryosphaeria rhodina*. *Australasian Plant Pathology* 34, 393–395.

Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Sams, C.E., 2004. Chitin and chitosan-value-added products from mushroom waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7905-7910.

Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Vallance, J., Grizard, D., Guyoneaud, R., & P. Rey, P., 2014. Induction of grapevine defence systems using the oomycete *Pythium oligandrum* against a pathogenic fungus involved in Esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 574-575.

Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., , Dufour, MC., Corio-Costet, MF., Guyoneaud, R., & Rey, P., 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, by inducing plant resistance. *Biological Control*, 92, 7-16.

Zhou, S., Smith, D.R., Stanosz, G.R., 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* 105, 919–26.

Sítios da Internet consultados para a taxonomia de *Phaeomoniella chlamydospora* e fungos Botryosphaeriaceae:

<http://www.eol.org/pages/998601/overview>, consultado dia 21-11-16

http://gcm.wfcc.info/speciesPage.jsp?strain_name=Phaeomoniella%20chlamydospora, consultado dia 21-11-16

<http://www.gbif.org/species/2598630>, consultado dia 21-11-16

<http://www.indexfungorum.org/Names/namesrecord.asp?RecordId=464779>, consultado dia 21-11-16

<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/4f549e9524dae580d01d4dc5fb75383c>, consultado dia 21-11-16

<http://www.mycobank.org/name/Botryosphaeriaceae&Lang=Eng>, consultado dia 21-11-16.

Outros sítios Internet consultados:

<http://oficinacientifica.com.br/downloads/Aula5%20Xilema.pdf>, consultado dia 13-02-17

<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=title>, consultado dia 15-02-17

8. Anexos

8.1. Anexo A

Análise de variâncias aos dados provenientes da casta Aragonez em Alenquer (Ensaio 1)

Quadro 8.1 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de severidade de Alenquer com inoculações de *Neofusicoccum parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
	2	2,3789	0,09866		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	2	5,13	2,57	25,36	2,10E-09
Resíduos	87	8,80	0,10		
Teste de Tukey	Dif.	Inf	Sup	p adj	Rej. H0
Esquive - Botry	-0,46	-0,65	-0,26	0,00	TRUE
Tri-wall - Botry	-0,54	-0,74	-0,35	0,00	TRUE
Tri-wall - Esquive	-0,09	-0,28	0,11	0,55	FALSE

Quadro 8.2 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis e inerente aos dados de incidência de Alenquer com inoculações de *Neofusicoccum parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value
	2	6,12	3,26E-03
Teste de Kruskal-Wallis	2	15,24	4,91E-04
Teste c.m. após Kruskal (pgirmess)	Diferença Obs.	Diferença crítica	Rej. H0
Esquive - Botry	16,50	16,15	TRUE
Tri-wall - Botry	21,00	16,15	TRUE
Tri-wall - Esquive	4,50	16,15	FALSE

Quadro 8.3 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados do comprimento da necrose (cm) (com "outliers") de Alenquer com inoculações de *Neofusicoccum parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
		2.00E-04	0.9882		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	2	6.8	3.402	1.57	0.217
Resíduos	57	123.6	2.168		
Teste de Tukey	Dif	Inf	Sup	p adj	Rej. H0
Esquive - Botry	-0.36	-1.47	0.74	0.71	FALSE
Tri-wall - Botry	-0.83	-1.97	0.30	0.19	FALSE
Tri-wall - Esquive	-0.47	-1.59	0.65	0.57	FALSE

Quadro 8.4 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados do comprimento da necrose (cm) (sem “outliers”) de Alenquer com inoculações de *Neofusicoccum parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
		2.20E-03	0.9624		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	2	11.05	5.524	2.944	0.0609
Resíduos	56	105.08	1.876		
Teste de Tukey	Dif	Inf	Sup	p adj	Rej. H0
Esquive - Botry	-0.36	-1.39	0.67	0.67	FALSE
Tri-wall - Botry	-1.07	-2.14	0.00	0.05	FALSE
Tri-wall - Esquive	-0.70	-1.76	0.36	0.26	FALSE

Quadro 8.5 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis e inerente aos dados de severidade de Alenquer com inoculações de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value
	2	10,21	1,04E-04
Teste de Kruskal-Wallis	2	17,38	1,68E-04
Teste c.m. após Kruskal (pgirmess)	Diferença Obs.	Diferença crítica	Rej. H0
Esquive - Phaeo	17,67	16,15	TRUE
Tri-wall - Phaeo	21,98	16,15	TRUE
Tri-wall - Esquive	4,32	16,15	FALSE

Quadro 8.6 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de incidência de Alenquer com inoculações de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
	2	2,9543	0,05737		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	2	3,62	1,81	9,83	1,42E-04
Resíduos	87	16,03	0,18		
Teste de Tukey	Dif.	Inf.	Sup.	p adj.	Rej. H0
Esquive - Phaeo	0,37	0,10	0,63	0,00	TRUE
Tri-wall - Phaeo	-0,47	-0,73	-0,20	0,00	TRUE
Tri-wall - Esquive	-0,10	-0,36	0,16	0,64	FALSE

Quadro 8.7 – ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de comprimento da necrose (cm) (com “outliers”) de Alenquer com inoculações de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
	2	1.5604	2.17E-01		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	2	86.2	43.1	9.997	1.86E-04
Resíduos	58	250.1	4.31		
Teste de Tukey	Dif	Inf	Sup	p adj	Rej. H0
Esquive - Phaeo	1.30	-0.26	2.86	0.12	FALSE
Tri-wall - Phaeo	-2.93	-4.51	-1.35	0.00	TRUE
Tri-wall - Esquive	-1.63	-3.19	-0.07	0.04	TRUE

Quadro 8.8 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey inerentes aos dados de comprimento da necrose (cm) (sem “outliers”) de Alenquer com inoculações de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
	2	0.9452	3.35E-01		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	2	93.45	46.73	13.41	1.74E-05
Resíduos	56	195.11	3.48		
Teste de Tukey	Dif	Inf	Sup	p adj	Rej. H0
Esquive - Phaeo	1.63	0.21	3.05	0.02	TRUE
Tri-wall - Phaeo	-3.09	-4.53	-1.65	0.00	TRUE
Tri-wall - Esquive	-1.47	-2.90	-0.03	0.045	TRUE

8.2. Anexo B

Análise de variâncias aos dados provenientes da casta Pinot Noir em Arruda dos Vinhos
(Ensaio 2)

Quadro 8.9 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade de Arruda dos Vinhos com inoculações de *Neofusicoccum parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste		p-value	
	8	24,60		1,39E-02	
Teste de Kruskal-Wallis	8	86,10		2,87E-12	
Método de c.m. após Kruskal com correção Bonferroni	Dif.	Inf.	Sup.	Rej. H0	p-value
BAS 516 AJ F-BAS 516 BX F	18,93	-43,08	80,95	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BY F	1,95	-60,07	63,97	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 BY F	-16,98	-79,00	45,03	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F	-72,52	-134,53	-10,50	TRUE	0,01
BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F	-91,45	-153,47	-29,43	TRUE	0,00
BAS 516 BY F-BAS 516 BZ F	-74,47	-136,48	-12,45	TRUE	0,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F	-62,98	-125,00	-0,97	TRUE	0,04
BAS 516 BX F-BAS 516 CA F	-81,92	-143,93	-19,90	TRUE	0,00
BAS 516 BY F-BAS 516 CA F	-64,93	-126,95	-2,92	TRUE	0,03
BAS 516 BZ F-BAS 516 CA F	9,53	-52,48	71,55	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CF F	-26,87	-88,88	35,15	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CF F	-45,80	-107,82	16,22	FALSE	0,66
BAS 516 BY F-BAS 516 CF F	-28,82	-90,83	33,20	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F	45,65	-16,37	107,67	FALSE	0,67
BAS 516 CA F-BAS 516 CF F	36,12	-25,90	98,13	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CG F	6,25	-55,77	68,27	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CG F	-12,68	-74,70	49,33	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-BAS 516 CG F	4,30	-57,72	66,32	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CG F	78,77	16,75	140,78	TRUE	0,00
BAS 516 CA F-BAS 516 CG F	69,23	7,22	131,25	TRUE	0,01
BAS 516 CF F-BAS 516 CG F	33,12	-28,90	95,13	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-difenoconazol	44,38	-17,63	106,40	FALSE	0,80
BAS 516 BX F-difenoconazol	25,45	-36,57	87,47	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-difenoconazol	42,43	-19,58	104,45	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-difenoconazol	116,90	54,88	178,92	TRUE	0,00
BAS 516 CA F-difenoconazol	107,37	45,35	169,38	TRUE	0,00
BAS 516 CF F-difenoconazol	71,25	9,23	133,27	TRUE	0,01
BAS 516 CG F-difenoconazol	38,13	-23,88	100,15	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-não tratado, com inoculação	-85,70	-147,72	-23,68	TRUE	0,00
BAS 516 BX F-não tratado, com inoculação	-104,63	-166,65	-42,62	TRUE	0,00
BAS 516 BY F-não tratado, com inoculação	-87,65	-149,67	-25,63	TRUE	0,00
BAS 516 BZ F-não tratado, com inoculação	-13,18	-75,20	48,83	FALSE	1,00
BAS 516 CA F-não tratado, com inoculação	-22,72	-84,73	39,30	FALSE	1,00
BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação	-58,83	-120,85	3,18	FALSE	0,09
BAS 516 CG F-não tratado, com inoculação	-91,95	-153,97	-29,93	TRUE	0,00
difenoconazol-não tratado, com inoculação	-130,08	-192,10	-68,07	TRUE	0,00

Quadro 8.10 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade (sem “outliers”) de Arruda dos Vinhos com inoculações de *Neofusicoccum parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste			p-value	
	8	7.0798			2.04E-08	
Teste de Kruskal-Wallis	8	48.8941			6.662e-08E-12	
Método de c.m. após Kruskal com correção Bonferroni	Dif.	Inf.	Sup.	Rej. H0	p-value	
BAS 516 AJ F-BAS 516 BX F	18.25	-41.19	77.69	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 BY F	20.31	-41.37	82.00	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-BAS 516 BY F	2.06	-59.62	63.75	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F	-69.88	-129.32	-10.44	TRUE	0.01	
BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F	-88.13	-147.57	-28.69	TRUE	0.00	
BAS 516 BY F-BAS 516 BZ F	-90.20	-151.88	-28.52	TRUE	0.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F	-60.87	-120.31	-1.43	TRUE	0.04	
BAS 516 BX F-BAS 516 CA F	-79.12	-138.56	-19.68	TRUE	0.00	
BAS 516 BY F-BAS 516 CA F	-81.18	-142.86	-19.50	TRUE	0.00	
BAS 516 BZ F-BAS 516 CA F	9.02	-50.42	68.46	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 CF F	-26.20	-85.64	33.24	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-BAS 516 CF F	-44.45	-103.89	14.99	FALSE	0.61	
BAS 516 BY F-BAS 516 CF F	-46.51	-108.20	15.17	FALSE	0.57	
BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F	43.68	-15.76	103.12	FALSE	0.68	
BAS 516 CA F-BAS 516 CF F	34.67	-24.77	94.11	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 CG F	19.73	-41.34	80.80	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-BAS 516 CG F	1.48	-59.59	62.55	FALSE	1.00	
BAS 516 BY F-BAS 516 CG F	-0.58	-63.84	62.67	FALSE	1.00	
BAS 516 BZ F-BAS 516 CG F	89.61	28.55	150.68	TRUE	0.00	
BAS 516 CA F-BAS 516 CG F	80.60	19.53	141.67	TRUE	0.00	
BAS 516 CF F-BAS 516 CG F	45.93	-15.14	107.00	FALSE	0.58	
BAS 516 AJ F-difenoconazol	47.48	-13.01	107.97	FALSE	0.44	
BAS 516 BX F-difenoconazol	29.23	-31.26	89.72	FALSE	1.00	
BAS 516 BY F-difenoconazol	27.16	-35.53	89.86	FALSE	1.00	
BAS 516 BZ F-difenoconazol	117.36	56.87	177.85	TRUE	0.00	
BAS 516 CA F-difenoconazol	108.34	47.85	168.83	TRUE	0.00	
BAS 516 CF F-difenoconazol	73.68	13.19	134.17	TRUE	0.00	
BAS 516 CG F-difenoconazol	27.74	-34.35	89.84	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-não tratado, com inoculação	-93.24	-153.73	-32.75	TRUE	0.00	
BAS 516 BX F-não tratado, com inoculação	-111.49	-171.98	-51.00	TRUE	0.00	
BAS 516 BY F-não tratado, com inoculação	-113.55	-176.25	-50.86	TRUE	0.00	
BAS 516 BZ F-não tratado, com inoculação	-23.35	-83.85	37.14	FALSE	1.00	
BAS 516 CA F-não tratado, com inoculação	-32.37	-92.86	28.12	FALSE	1.00	
BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação	-67.04	-127.53	-6.55	TRUE	0.01	
BAS 516 CG F-não tratado, com inoculação	-112.97	-175.06	-50.88	TRUE	0.00	
difenoconazol-não tratado, com inoculação	-140.71	-202.24	-79.19	TRUE	0.00	

Quadro 8.11 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correcção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade de Arruda dos Vinhos com inoculações de *Pa. chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste			p-value
	8	3,42			9,26E-04
Teste de Kruskal-Wallis	8	32,43			7,78E-05
Método de c.m após Kruskal com correcção Bonferroni	Dif.	Inf.	Sup.	Rej. H0	p-value
BAS 516 AJ F-BAS 516 BX F	11,93	-45,59	69,46	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BY F	-17,63	-75,16	39,89	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 BY F	-29,57	-87,09	27,96	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F	-51,08	-108,61	6,44	FALSE	0,16
BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F	-63,02	-120,54	-5,49	TRUE	0,02
BAS 516 BY F-BAS 516 BZ F	-33,45	-90,97	24,07	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F	-44,88	-102,41	12,64	FALSE	0,45
BAS 516 BX F-BAS 516 CA F	-56,82	-114,34	0,71	FALSE	0,06
BAS 516 BY F-BAS 516 CA F	-27,25	-84,77	30,27	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CA F	6,20	-51,32	63,72	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CF F	1,30	-56,22	58,82	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CF F	-10,63	-68,16	46,89	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-BAS 516 CF F	18,93	-38,59	76,46	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F	52,38	-5,14	109,91	FALSE	0,13
BAS 516 CA F-BAS 516 CF F	46,18	-11,34	103,71	FALSE	0,37
BAS 516 AJ F-BAS 516 CG F	-21,93	-79,46	35,59	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CG F	-33,87	-91,39	23,66	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-BAS 516 CG F	-4,30	-61,82	53,22	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CG F	29,15	-28,37	86,67	FALSE	1,00
BAS 516 CA F-BAS 516 CG F	22,95	-34,57	80,47	FALSE	1,00
BAS 516 CF F-BAS 516 CG F	-23,23	-80,76	34,29	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-difenoconazol	-5,80	-63,32	51,72	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-difenoconazol	-17,73	-75,26	39,79	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-difenoconazol	11,83	-45,69	69,36	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-difenoconazol	45,28	-12,24	102,81	FALSE	0,43
BAS 516 CA F-difenoconazol	39,08	-18,44	96,61	FALSE	1,00
BAS 516 CF F-difenoconazol	-7,10	-64,62	50,42	FALSE	1,00
BAS 516 CG F-difenoconazol	16,13	-41,39	73,66	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-não tratado, com inoculação	-59,85	-117,37	-2,33	TRUE	0,03
BAS 516 BX F-não tratado, com inoculação	-71,78	-129,31	-14,26	TRUE	0,00
BAS 516 BY F-não tratado, com inoculação	-42,22	-99,74	15,31	FALSE	0,68
BAS 516 BZ F-não tratado, com inoculação	-8,77	-66,29	48,76	FALSE	1,00
BAS 516 CA F-não tratado, com inoculação	-14,97	-72,49	42,56	FALSE	1,00
BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação	-61,15	-118,67	-3,63	TRUE	0,02
BAS 516 CG F-não tratado, com inoculação	-37,92	-95,44	19,61	FALSE	1,00
difenoconazol-não tratado, com inoculação	-54,05	-111,57	3,47	FALSE	0,10

Quadro 8.12 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de severidade (sem “outliers”) de Arruda dos Vinhos com inoculações de *Pa. chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste			p-value	
	8	7.0798			2.04E-08	
Teste de Kruskal-Wallis	8	48.8941			6.662e-08E-12	
Método de c.m. após Kruskal com correção Bonferroni	Dif.	Inf.	Sup.	Rej. H0	p-value	
BAS 516 AJ F-BAS 516 BX F	29.48	-27.62	86.58	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 BY F	-3.40	-58.63	51.83	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-BAS 516 BY F	-32.88	-91.42	25.65	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F	-52.60	-105.85	0.65	FALSE	0.06	
BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F	-82.08	-138.76	-25.41	TRUE	0.00	
BAS 516 BY F-BAS 516 BZ F	-49.20	-103.99	5.60	FALSE	0.15	
BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F	-46.18	-99.44	7.07	FALSE	0.20	
BAS 516 BX F-BAS 516 CA F	-75.67	-132.34	-18.99	TRUE	0.00	
BAS 516 BY F-BAS 516 CA F	-42.78	-97.58	12.01	FALSE	0.45	
BAS 516 BZ F-BAS 516 CA F	6.42	-46.38	59.22	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-BAS 516 CF F	1.22	-52.48	54.93	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-BAS 516 CF F	-28.26	-85.36	28.84	FALSE	1.00	
BAS 516 BY F-BAS 516 CF F	4.63	-50.60	59.86	FALSE	1.00	
BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F	53.82	0.57	107.08	TRUE	0.04	
BAS 516 CA F-BAS 516 CF F	47.41	-5.85	100.66	FALSE	0.16	
BAS 516 AJ F-BAS 516 CG F	-20.79	-74.50	32.91	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-BAS 516 CG F	-50.28	-107.37	6.82	FALSE	0.18	
BAS 516 BY F-BAS 516 CG F	-17.39	-72.62	37.84	FALSE	1.00	
BAS 516 BZ F-BAS 516 CG F	31.81	-21.45	85.06	FALSE	1.00	
BAS 516 CA F-BAS 516 CG F	25.39	-27.86	78.64	FALSE	1.00	
BAS 516 CF F-BAS 516 CG F	-22.02	-75.72	31.69	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-difenoconazol	-2.02	-56.20	52.16	FALSE	1.00	
BAS 516 BX F-difenoconazol	-31.50	-89.05	26.05	FALSE	1.00	
BAS 516 BY F-difenoconazol	1.38	-54.31	57.08	FALSE	1.00	
BAS 516 BZ F-difenoconazol	50.58	-3.15	104.32	FALSE	0.09	
BAS 516 CA F-difenoconazol	44.17	-9.57	97.90	FALSE	0.31	
BAS 516 CF F-difenoconazol	-3.24	-57.42	50.94	FALSE	1.00	
BAS 516 CG F-difenoconazol	18.78	-35.41	72.96	FALSE	1.00	
BAS 516 AJ F-não tratado, com inoculação	-61.08	-114.34	-7.83	TRUE	0.01	
BAS 516 BX F-não tratado, com inoculação	-90.57	-147.24	-33.89	TRUE	0.00	
BAS 516 BY F-não tratado, com inoculação	-57.68	-112.48	-2.89	TRUE	0.03	
BAS 516 BZ F-não tratado, com inoculação	-8.48	-61.28	44.32	FALSE	1.00	
BAS 516 CA F-não tratado, com inoculação	-14.90	-67.70	37.90	FALSE	1.00	
BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação	-62.31	-115.56	-9.05	TRUE	0.01	
BAS 516 CG F-não tratado, com inoculação	-40.29	-93.54	12.96	FALSE	0.56	
difenoconazol-não tratado, com inoculação	-59.07	-112.80	-5.33	TRUE	0.02	

Quadro 8.13 - Análise de variâncias utilizando o método de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni e inerente aos dados de incidência de Arruda dos Vinhos com inoculações de *N. parvum*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste			p-value
	8	2,92			3,83E-03
Teste de Kruskal-Wallis	8	50,07			3,96E-08
Método de c.m após Kruskal com correção Bonferroni	Dif.	Inf.	Sup.	Rej. H0	p-value
BAS 516 AJ F-BAS 516 BX F	13,50	-41,02	68,02	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BY F	-13,50	-68,02	41,02	FTR	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 BY F	-27,00	-81,52	27,52	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F	-49,50	-104,02	5,02	FTR	0,13
BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F	-63,00	-117,52	-8,48	TRUE	0,01
BAS 516 BY F-BAS 516 BZ F	-36,00	-90,52	18,52	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F	-40,50	-95,02	14,02	FTR	0,63
BAS 516 BX F-BAS 516 CA F	-54,00	-108,52	0,52	FTR	0,06
BAS 516 BY F-BAS 516 CA F	-27,00	-81,52	27,52	FTR	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CA F	9,00	-45,52	63,52	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CF F	-36,00	-90,52	18,52	FTR	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CF F	-49,50	-104,02	5,02	FTR	0,13
BAS 516 BY F-BAS 516 CF F	-22,50	-77,02	32,02	FTR	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F	13,50	-41,02	68,02	FTR	1,00
BAS 516 CA F-BAS 516 CF F	4,50	-50,02	59,02	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CG F	-9,00	-63,52	45,52	FTR	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CG F	-22,50	-77,02	32,02	FTR	1,00
BAS 516 BY F-BAS 516 CG F	4,50	-50,02	59,02	FTR	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CG F	40,50	-14,02	95,02	FTR	0,63
BAS 516 CA F-BAS 516 CG F	31,50	-23,02	86,02	FTR	1,00
BAS 516 CF F-BAS 516 CG F	27,00	-27,52	81,52	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-difenoconazol	27,00	-27,52	81,52	FTR	1,00
BAS 516 BX F-difenoconazol	13,50	-41,02	68,02	FTR	1,00
BAS 516 BY F-difenoconazol	40,50	-14,02	95,02	FTR	0,63
BAS 516 BZ F-difenoconazol	76,50	21,98	131,02	TRUE	0,00
BAS 516 CA F-difenoconazol	67,50	12,98	122,02	TRUE	0,00
BAS 516 CF F-difenoconazol	63,00	8,48	117,52	TRUE	0,01
BAS 516 CG F-difenoconazol	36,00	-18,52	90,52	FTR	1,00
BAS 516 AJ F-não tratado, com inoculação	-63,00	-117,52	-8,48	TRUE	0,01
BAS 516 BX F-não tratado, com inoculação	-76,50	-131,02	-21,98	TRUE	0,00
BAS 516 BY F-não tratado, com inoculação	-49,50	-104,02	5,02	FTR	0,13
BAS 516 BZ F-não tratado, com inoculação	-13,50	-68,02	41,02	FTR	1,00
BAS 516 CA F-não tratado, com inoculação	-22,50	-77,02	32,02	FTR	1,00
BAS 516 CF F-não tratado, com inoculação	-27,00	-81,52	27,52	FTR	1,00
BAS 516 CG F-não tratado, com inoculação	-54,00	-108,52	0,52	FTR	0,06
difenoconazol-não tratado, com inoculação	-90,00	-144,52	-35,48	TRUE	0,00

Quadro 8.14 - ANOVA a 1 fator e teste de Tukey com correção de Bonferroni e inerente aos dados de incidência de Arruda dos Vinhos com inoculações de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Teste de Levene	G. de liberdade	Estatística do teste	p-value		
	8	0,7071	0,6852		
ANOVA a 1 fator	G.I.	SQ	QM	Estatística do teste	p-value
Tratamento	8	4,87	0,61	2,61	9,11E-03
Resíduos	261	60,83	0,23		
Teste de Tukey	Dif.	Inf.	Sup.	Rej. H0	p-value
BAS 516 AJ F-BAS 516 BX F	-0,07	-0,46	0,32	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BY F	0,10	-0,29	0,49	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 BZ F	0,27	-0,12	0,66	FALSE	0,45
BAS 516 AJ F-BAS 516 CA F	0,23	-0,16	0,62	FALSE	0,63
BAS 516 AJ F-BAS 516 CF F	0,00	-0,39	0,39	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-BAS 516 CG F	0,10	-0,29	0,49	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-difenoconazol	0,07	-0,32	0,46	FALSE	1,00
BAS 516 AJ F-Não tratado, com inoculação	0,37	-0,02	0,76	FALSE	0,08
BAS 516 BX F-BAS 516 BY F	0,17	-0,22	0,56	FALSE	0,92
BAS 516 BX F-BAS 516 BZ F	0,33	-0,06	0,72	FALSE	0,16
BAS 516 BX F-BAS 516 CA F	0,30	-0,09	0,69	FALSE	0,28
BAS 516 BX F-BAS 516 CF F	0,07	-0,32	0,46	FALSE	1,00
BAS 516 BX F-BAS 516 CG F	0,17	-0,22	0,56	FALSE	0,92
BAS 516 BX F-difenoconazol	0,13	-0,26	0,52	FALSE	0,98
BAS 516 BX F-Não tratado, com inoculação	0,43	0,04	0,82	TRUE	0,02
BAS 516 BY F-BAS 516 BZ F	0,17	-0,22	0,56	FALSE	0,92
BAS 516 BY F-BAS 516 CA F	0,13	-0,26	0,52	FALSE	0,98
BAS 516 BY F-BAS 516 CF F	-0,10	-0,49	0,29	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-BAS 516 CG F	0,00	-0,39	0,39	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-difenoconazol	-0,03	-0,42	0,36	FALSE	1,00
BAS 516 BY F-Não tratado, com inoculação	0,27	-0,12	0,66	FALSE	0,45
BAS 516 BZ F-BAS 516 CA F	-0,03	-0,42	0,36	FALSE	1,00
BAS 516 BZ F-BAS 516 CF F	-0,27	-0,66	0,12	FALSE	0,45
BAS 516 BZ F-BAS 516 CG F	-0,17	-0,56	0,22	FALSE	0,92
BAS 516 BZ F-difenoconazol	-0,20	-0,59	0,19	FALSE	0,80
BAS 516 BZ F-Não tratado, com inoculação	0,10	-0,29	0,49	FALSE	1,00
BAS 516 CA F-BAS 516 CF F	-0,23	-0,62	0,16	FALSE	0,63
BAS 516 CA F-BAS 516 CG F	-0,13	-0,52	0,26	FALSE	0,98
BAS 516 CA F-difenoconazol	-0,17	-0,56	0,22	FALSE	0,92
BAS 516 CA F-Não tratado, com inoculação	0,13	-0,26	0,52	FALSE	0,98
BAS 516 CF F-BAS 516 CG F	0,10	-0,29	0,49	FALSE	1,00
BAS 516 CF F-difenoconazol	0,07	-0,32	0,46	FALSE	1,00
BAS 516 CF F-Não tratado, com inoculação	0,37	-0,02	0,76	FALSE	0,08
BAS 516 CG F-difenoconazol	-0,03	-0,42	0,36	FALSE	1,00
BAS 516 CG F-Não tratado, com inoculação	0,27	-0,12	0,66	FALSE	0,45
difenoconazol-Não tratado, com inoculação	0,30	-0,09	0,69	FALSE	0,28